

VILNIAUS UNIVERSITETAS

EGLĖ PREIKŠAITIENĖ

ASMENŲ, TURINČIŲ INTELEKTINĘ NEGALIĄ, GENOMO STRUKTŪRINIŲ
POKYČIŲ ĮTAKOS FENOMUI ĮVERTINIMAS

Daktaro disertacija

Biomedicinos mokslai, medicina (06 B)

Vilnius, 2013 metai

Disertacija rengta 2011–2013 metais Vilniaus universitete

Mokslinis vadovas:

Prof. dr. Algirdas Utkus (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B)

LMA tikrasis narys, prof. habil. dr. Vaidutis Kučinskas (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B). Darbo laikotarpis 2011 spalio mėn. – 2012 kovo mėn.

Konsultantas:

LMA tikrasis narys, prof. habil. dr. Vaidutis Kučinskas (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B)

TURINYS

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS	5
I. ĮVADAS.....	7
II. TYRIMŲ APŽVALGA	16
2.1 Intelektinės negalios apibrėžtis ir klasifikacija.....	16
2.2 Klinikinės citogenetikos technologijų raida	17
2.3 Žmogaus genomo struktūriniai pokyčiai	19
2.3.1 Apibrėžtis, reikšmė	19
2.3.2 Susidarymo mechanizmai	20
2.3.3 Patogeniškumo kriterijai	20
2.3.4 Įtaka CNS raidos ir funkcijos sutrikimams.....	22
2.4 Chromosominių pokyčių fenomika	23
2.5 Duomenų bazių naudojimas genotipo-fenotipo ryšiui nustatyti.....	24
2.6 Nauji mikrodeleciniai/ mikroduplicaciniai sindromai	25
2.7 Patogeninių kopijų skaičiaus pokyčių reikšmė, nustatant CNS raidai ir funkcijai svarbius genus.....	27
III. DARBO METODOLOGIJA	29
3.1 Pirmojo darbo uždavinio vykdymo eiga ir metodai	29
3.1.1 Pacientų atranka tyrimui	29
3.1.2 Klinikinių duomenų ir DNR rinkimas	31
3.2 Antrojo darbo uždavinio vykdymo eiga ir metodai.....	33
3.3 Kitų darbo uždavinių vykdymo eiga ir metodai	35
IV. TYRIMŲ REZULTATAI	38
4.1 Patogeninių kopijų skaičiaus pokyčių charakteristikos tirtiems asmenims, turintiems intelektinę negalią	38
4.2 Genominių pokyčių fenominės charakteristikos	46
4.2.1 Tyrime dalyvavusių asmenų, turinčių intelektinę negalią, klinikinių požymių analizės rezultatai.....	46
4.2.2 Pacientų su chromosominiais pokyčiais ir be jų klinikinių požymių palyginimo rezultatai	55

4.3 Pacientų su unikaliais patogeniniais kopijų skaičiaus pokyčiais genotipo-fenotipo ryšio analizė ir genų kandidatų intelektinei negaliai bei kitiems klinikiams požymiams nustatymas.....	69
4.3.1 Klinikinis ir molekulinis 7p22.1 mikroduplicacijos apibūdinimas	69
4.3.2 Klinikinis ir molekulinis 17q21.33 mikrodelecijos apibūdinimas.....	80
4.3.3 Klinikinis ir molekulinis 2q34 mikrodelecijos apibūdinimas.....	86
4.4 Žinomo geno reguliacinės srities identifikavimas.....	92
4.5 Sudėtingų chromosominių persitvarkymų klinikinės pasekmės ir genetinio konsultavimo ypatumai	98
4.6 Asmenų, turinčių intelektinę negalią, genetinio ištyrimo gairės	102
V. IŠVADOS	110
I priedas. Sutikimo ir asmens informavimo formos	111
II priedas. Klausimynas, skirtas pacientų klinikiams duomenims rinkti.....	115
III priedas. Darbo vykdymo etapai	117
NAUDOTOS LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	118
CURRICULUM VITAE.....	134
PADĖKA	137

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

AD – autosominis dominantinis

ARFS – ADP – ribozilinimo faktorius

Bp – bazių pora

BPA – Britų pediatrijos asociacija

CING – Kipro neurologijos ir genetikos institutas

CMV – citomegalo virusas

CNS – centrinė nervų sistema

DECIPHER – *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources*

DGV – *Database of Genomic Variants*

DNR – deoksiribonukleorūgštis

EEG – elektroencefalograma

FISH – fluorescencinė *in situ* hibridizacija

FY – fenotipinis ypatumas

IQ – intelekto koeficientas

INN – intelektinė negalia

ĮA – įgimta anomalija

kb – kilobazė

KMI – kūno masės indeksas

KSP – kopijų skaičiaus pokytis

KT – kompiuterinė tomografija

MA – mikroanomalija

Mb – megabazė

MGC – Medicininės genetikos centras

MRT – magnetinio rezonanso tomografija

NAHR – nealelinė homologinė rekombinacija

NCBI – *National center of biotechnology information*

OMIM – *Online Mendelian Inheritance in Man*

RL-PGR – realaus laiko polimerazės grandininė reakcija

s. – sindromas

SD – standartinis nuokrypis

SLŽA – sudėtinė nuo ligacijos priklausomų žymenų amplifikacija

UNIBO – Alma Mater Studiorum – Bolonijos universitetas

UTARTU – Tartu universitetas

vLGH – vektorinė lyginamoji genomo hibridizacija

VNP – vieno nukleotido polimorfizmas

VNP-LGH – vieno nukleotido polimorfizmu paremta lyginamoji genomo hibridizacija

VUL SK – Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikos

VU ŽMGK – Vilniaus universiteto Žmogaus ir medicininės genetikos katedra

ŽIV – žmogaus imunodeficito virusas

I. ĮVADAS

Dažniausias centrinės nervų sistemos (CNS) raidos sutrikimo klinikinis pasireiškimas – intelektinė negalia (INN). Genomo struktūriniai pokyčiai su INN siejami dar nuo 1959 metų, kai buvo nustatyta, kad papildoma 21 chromosoma lemia *Down* sindromą. Tolesni pacientų, turinčių INN, tyrimai atskleidžia vis daugiau INN priežasčių, kurių svarbią dalį sudaro submikroskopiniai chromosominiai persitvarkymai, vadinami patogeniniais DNR kopijų skaičiaus pokyčiais. Šio mokslinio darbo metu buvo atlikti didelės skiriamosios gebos molekulinio kariotipavimo tyrimai asmenims, turintiems INN. Gautų rezultatų pagrindu buvo įvertinta patogeninių kopijų skaičiaus pokyčių įtaka pacientų, turinčių INN, fenotipui, apibūdinti galimi nauji mikrodeleciniai/mikroduplicaciniai sindromai, nustatyti genai kandidatai INN ir kitiems klinikiniais požymiams bei paruoštos pacientų, turinčių INN, genetinio ištyrimo gairės.

Darbo temos aktualumas

Intelektinė negalia, taip pat vadinama protiniu atsilikimu ar kognityviniu sutrikimu, yra įvairiai pasireiškianti būklė, dažnai siejama su didelės įvairovės ir sunkumo fenotipiniais požymiais. Ji apibrėžiama kaip žymiai mažesnė nei vidutinė intelektinė funkcija su adaptacinių įgūdžių ribotumu, pasireiškianti iki 18 metų amžiaus (1). Intelektinė negalia diagnozuojama 2-3 % asmenų populiacijoje (2) ir tai yra labai svarbi socialinė bei ekonominė sveikatos priežiūros problema visame pasaulyje (3).

Intelektinė negalia yra vienas iš sudėtingiausių sutrikimų dėl savo heterogeninės etiologijos. Manoma, kad ribinis intelektas ir lengva INN atspindi apatinę normalaus intelekto rėžio ribą ir pasireiškia dėl daugelio genetinių bei negenetinių (aplinkos) veiksnių sąveikos. Sunkios INN formos, priešingai, siejamos su ypatingai sunkiais atvejais, tokiais, kaip perinatalinė asfiksija ar prenatalinė infekcija, bet dažniau – specifinėmis genetinėmis priežastimis, tiek chromosominėmis aberacijomis, tiek vieno geno defektais (4). Manoma, kad aplinkos veiksniai, pradedant nuo prenatalinių, tokių, kaip infekcijos (ŽIV, CMV), motinos metabolinės ligos (diabetas, fenilketonurija), teratogenai (alkoholis, karbamazepinas, hidantoinas, trimetadionas, retinoinė rūgštis, varfarinas), ir baigiant perinatalinėmis bei postnatalinėmis priežastimis, tokiomis, kaip neišnešiotumas, meningoencefalitas,

galvos smegenų trauma, lemia apie 30 % INN atvejų (5). Likusios priežastys – genetinės. Pastarojo dešimtmečio laikotarpiu stebima didelė pažanga INN genetinių priežasčių nustatymo srityje, tačiau diagnostika išlieka sudėtinga dėl gausybės skirtingų genetinių defektų, pasireiškiančių dažnai vienas nuo kito kliniškai neatskiriamaiais fenotipais. Citogenetiškai matomi chromosominiai pokyčiai aptinkami vidutiniškai 15 % pacientų, turinčių INN (2). Pastaraisiais metais diagnostikoje pradėjus taikyti molekulinio kariotipavimo metodus, nustatyta, kad pagal dažnumą lygiai tokia pat svarbi INN priežastis yra mažesnės delecijos ir duplikacijos, neaptinkamos standartiniu kariotipo tyrimu. Apie 10 % INN atvejų lemia monogeninės ligos, dar 10 % siejama su epigenetiniais ir daugiaveiksniais sutrikimais. Nepaisant žymaus technologinio progreso genetikos mokslo srityje, atlikus genetinius tyrimus, INN priežastis lieka nežinoma iki 50 % atvejų (6).

Mokslo žinių gilinimo INN srityje reikšmė yra prioritetinė dėl šios būklės paplitimo populiacijoje masto, ilgalaikių socialinių ir ekonominių priežasčių bei ribotų gydymo galimybių (7). Naujų genetinių technologijų, ypač molekulinio kariotipavimo, taikymas per pastaruosius kelerius metus padėjo atskleisti daug naujų patogeninių chromosominių pokyčių (8, 9), ir reikšminga INN atvejų dalis, anksčiau priskirta idiopatinės INN grupei, šiuo metu klasifikuojama kaip sindrominės būklės, su kliniškai atpažįstamais specifiniais fenotipais (10). Pastaraisiais metais gausus naujų pacientų su žinomais mikrodeleciniais/ mikroduplikaciniais sindromais apibūdinimas papildė žinomų genetinių sindromų fenomikos žinias. Be to, molekulinis kariotipavimas leidžia susiaurinti žinomų genetinių sindromų kritines sritis ar net identifikuoti kritinius sindromui genus, kurių kiekybiniai ar struktūros pokyčiai lemia pacientų fenotipą. INN genų identifikavimui skiriamas ypatingas dėmesys. Manoma, kad daugelio iki šiol nežinomos etiologijos INN atvejų priežastys yra autosominių genų mutacijos. Vadovaujantis duomenimis, kad 10-12 % X chromosomoje esančių genų siejami su INN, numanomas minimalus autosominių INN genų skaičius galėtų būti 800-850 (3), o kitų autorių duomenimis, net apie 2000 genų reikšmingi INN patogenezėje (11), iš kurių iki šiol identifikuota tik labai nedidelė dalis. Pacientų su intelektinę negalią lemiančiais chromosominiais pokyčiais fenomikos detalizavimas, naujų kliniškai atpažįstamų sindromų nustatymas, žinomų

mikrodelecinių/ mikroduplikacinių sindromų detalesnis charakterizavimas ir kritinių INN genų identifikavimas yra efektyvios genetinės diagnostikos pagrindas.

Genetinės diagnozės nustatymas yra fundamentalus, norint suprasti INN problemos esmę ir sukurti gydymo galimybes. Genetinio konsultavimo kontekste diagnozės žinojimas neabejotinai svarbus pacientui, jo šeimai ir gydytojui. Kai kuriais atvejais pacientui gali būti skirtas gydymas, tam tikros intervencijos, konsultacijos, išankstinis patikrinimas dėl galimų ligos komplikacijų ir funkcinių sutrikimų, sudarytas mokymo planavimas bei išvengiama įvairių nereikalingų tyrimų. Šeimai naudingas ligos nešiotojų išaiškinimas, prognozės šeimai pateikimas, efektyvi prenatalinė diagnostika, jungimasis į atitinkamas medicinines, socialines, paramos organizacijas, konkretus mokymas ir bendravimas su tokią pat diagnozę turinčiomis šeimomis. Žinodamas diagnozę, gydytojas gali sekti mokslo pažangą bei naujas mokslo galimybes, koreguoti paciento priežiūros planą, gydymą. (12, 13).

Darbo tikslas, uždaviniai

Tikslas – nustatyti patogeninių DNR kopijų skaičiaus pokyčių įtaką asmenų, turinčių intelektualinę negalią, fenotipui ir CNS raidos bei funkcijos sutrikimams.

Uždaviniai:

1. Įvertinti patogeninių kopijų skaičiaus pokyčių ypatumus bei klinikines pasekmes tirtiems asmenis, turintiems INN ir nustatyti molekulinio kariotipavimo tyrimo diagnostinį efektyvumą.
2. Nustatyti asmenų su patogeniniais kopijų skaičiaus pokyčiais fenotipo ypatumus, lyginant su pacientais, kuriems molekulinio kariotipavimo tyrimais patologijos nenustatyta.
3. Atlikus pacientų su unikaliais patogeniniais kopijų skaičiaus pokyčiais genotipo-fenotipo ryšio analizę duomenų bazių ir literatūros duomenų pagrindu, detalizuoti su šiais chromosominiais pokyčiais siejamą fenotipą ir nustatyti genus kandidatus INN bei kitiems klinikiniais požymiams.
4. Įvertinti nustatytų patogeninių kopijų skaičiaus pokyčių reikšmę žinomų INN genų raiškai.

5. Įvertinti sudėtingų chromosominių persitvarkymų galimas kliniines pasekmes ir jų reikšmę genetiniam konsultavimui.
6. Vadovaujantis literatūros duomenų analizės ir atliktų tyrimų rezultatais, sudaryti pacientų, turinčių INN, genetinio ištyrimo gaires.

Darbo naujumas ir reikšmė

Pastarųjų metų progresas INN genetikos srityje siejamas su molekulinio kariotipavimo metodų (vektorinės lyginamosios genomo hibridizacijos, sutr. vLGH, ir vieno nukleotido polimorfizmu paremtos lyginamosios genomo hibridizacijos, sutr. VNP-LGH) pritaikymu pacientų, turinčių INN, tyrimams. vLGH atliekama naudojant genominių lustų su žinoma seka išdėstytais skirtingais genomo DNR fragmentais (zondais), ant kurių konkurencingai kohibridizuojasi skirtingais fluorochromais pažymėtos kontrolinė genomine DNR ir tiriamoji DNR, o fluorescenciniai signalai kiekviename hibridizacijos taške analizuojami kompiuterine programa. Taigi atsirado galimybė vieno tyrimo metu didele skiriamąja geba pakankamai tiksliai nustatyti kiekybinius chromosominius persitvarkymus visame genome. Molekulinis kariotipavimas gerokai pranašesnis už kitus citogenetinius ir molekulinis citogenetinius tyrimo metodus, kadangi dėl didelės skiriamosios gebos suteikia išsamios informacijos, yra jautrus ir greitai atliekamas. Tyrimo metu galima aptikti bet kurios genominiame luste esančios srities segmentinę nesubalansuotumą (aneuploidiją, deleciją, duplikaciją). Molekulinio kariotipavimo technologijos genominių pakitimų nustatymo pajėgumu lenkia alternatyvius metodus, pavyzdžiui, sudėtinės nuo ligacijos priklausomų žymenų amplifikacijos (SLŽA) metodą arba subtelomerinę fluorescentinę *in situ* hibridizaciją (FISH) (14). Pastaraisiais metais atliktų daugelio mokslinių tyrimų duomenimis, molekulinio kariotipavimo metodai yra efektyvūs nustatant genetinę INN etiologiją, o jų diagnostinis našumas asmenims, kuriems diagnozė nebuvo nustatyta, atlikus tradicinius citogenetinius tyrimus, yra apie 10 % (15). Informacija apie chromosominio pokyčio pobūdį, dydį ir pokyčio srityje esančius genus leidžia identifikuoti žinomus mikrodelecinius/ mikroduplikacinius sindromus, susiaurinti žinomų genetinių sindromų kritines sritis ar net identifikuoti kritinius sindromui genus, kurių kiekybiniai ar struktūros pokyčiai lemia fenotipą, taip

pat atrasti naujų mikrodelecinių/ mikroduplikacinių sindromų bei patikslinti ligų patogenezinius mechanizmus.

Molekulinio kariotipavimo taikymas reikšmingai pakeitė naujų sindromų identifikavimo ir apibūdinimo strategijas. Istoriskai daugelis genominių sutrikimų pirmiausia būdavo apibūdinami vadovaujantis pacientų grupei būdingais bendrais klinikiniais požymiais, o vėliau nustatoma sutrikimą lemianti genetinė priežastis („pirmiausia fenotipas“ principas). Molekulinio kariotipavimo technologijų dėka žengiama į „pirmiausia genotipas“ erą. Visų pirma identifikuojami individai su persidengiančiais chromosominiais persitvarkymais, po to lyginami jų klinikiniai požymiai ir apibūdinamas sindromas.

Keičiasi ir su INN susijusių genų identifikavimo principai. Iki 2000-ųjų metų su INN (ir su kitomis būklėmis ar ligomis) siejamų genų identifikavimas dažniausiai buvo atliekamas sankibos ir pozicinio klonavimo metodais. Tai reiškia, kad tyrimams atlikti reikėjo šeimų, kuriose yra daug asmenų su numanoma tos pačios etiologijos INN. Kuo didesnė šeima, tuo potencialiai mažesnį sankibos intervalą įmanoma identifiukuoti. Tačiau autosominiai genų mutacijų (dominantinio efekto) atvejai, lemiantys sunkią INN, paprastai būna sporadiniai, nes sergantieji nesusilaukia palikuonių. Kritinių genų identifikavimas buvo galimas išskirtiniais atvejais, dažniausiai nustačius subalansuotų translokacijų trūkių srityse esančius genus ar tiriant sergančiuosius iš giminių santuokų (recesyvinio efekto mutacijos). Molekuliniu kariotipavimu INN lemiantis patogeninis kopijų skaičiaus pokytis aptinkamas tiriant vienintelį pacientą. Kritinės INN genomines srities detalesni tyrimai gali padėti identifiukuoti genus, reikšmingus CNS raidai ir funkcionavimui.

Šis darbas – tai 211 asmenų, turinčių INN, tyrimas, kurio rezultatų pagrindas – tiriamųjų klinikinių požymių ir patogeninių kopijų skaičiaus pokyčių, nustatytų atliekant molekulinį kariotipavimą, vertinimas. Tai vienas pirmųjų tokio pobūdžio darbas Lietuvoje ir Rytų Europoje. Tirta didelė imtis pacientų su INN ir atsitiktine fenotipinių požymių įvairove. Pirmą kartą Lietuvoje tyrimai atlikti aukštos skiriamosios gebos vLGH ir VNP-LGH metodais. Gauti rezultatai suteikė išsamesnės informacijos apie pacientų su patogeniniais kopijų skaičiaus pokyčiais fenomiką. Nustatytų chromosominių persitvarkymų analizė atskleidė naujų patogeninių kopijų

skaičiaus pokyčių klininius ypatumus, naujus INN kandidatinius genus, jų raiškos ypatumus. Tyrimo metu išaiškintos genetinės diagnozės pacientams (efektyvaus genetinio konsultavimo pagrindas), paruoštos rekomendacijos dėl pacientų ištyrimo esant INN.

Ginamieji teiginiai:

1. Molekulinio kariotipavimo diagnostinis efektyvumas didesnis nei 10 %.
2. Pacientams su patogeniniais kopijų skaičiaus pokyčiais būdingi specifiniai klininiai požymiai.
3. Patogeninių kopijų skaičiaus pokyčių nustatymas reikšmingas naujiems mikrodeleciniams/ mikroduplikaciniams sindromams apibūdinti.
4. Patogeninių kopijų skaičiaus pokyčių analizė svarbi kandidatiniams INN genams ir genų reguliacinėms sritims nustatyti.
5. Molekulinio kariotipavimo technologijų taikymas diagnostikoje keičia pacientų, turinčių INN, genetinio ištyrimo gaires.

Darbo aprobacija

Publikacijos disertacijos tema:

1. Preikšaitienė E, Kasnauskienė J, Utkus A, Kučinskas V. Asmenų su intelektine negalia genetinio ištyrimo gairės. Neurologijos seminarai. 2012; 16(54): 283-288.
2. Preiksaitiene E, Männik K, Dirse V, Utkus A, Ciuladaite Z, Kasnauskiene J, Kurg A, Kucinskas V. A novel *de novo* 1.8 Mb microdeletion of 17q21.33 associated with intellectual disability and dysmorphic features. Eur J Med Genet. 2012 Nov; 55(11):656-9.
3. Preiksaitiene E, Kasnauskiene J, Ciuladaite Z, Tumiene B, Patsalis PC, Kučinskas V. Clinical and molecular characterization of a second case of 7p22.1 microduplication. Am J Med Genet A. 2012 May; 158A(5):1200-3.
4. Preikšaitienė E, Utkus A, Čiuladaitė Ž, Kasnauskienė J, Kučinskas V. Genetinės diagnozės nustatymas esant intelektinei negaliai: Phelan-McDermid sindromo pavyzdys. Sveikatos mokslai. 2012(1):73-77.

5. Preikšaitienė E, Kučinskas V. Molekulinės citogenetikos klinikinis pritaikymas nustatant protinio atsilikimo etiologiją. *Laboratorinė medicina*. 2010; 3(47):132:136.
6. Kasnauskiene J, Ciuladaite Z, Preiksaitiene E, Utkus A, Pečiulyte A, Kučinskas V. A new single gene deletion on 2q34: ERBB4 is associated with intellectual disability. *Am J Med Genet A*. 2013 Jun; 161(6):1487-90.
7. Kasnauskiene J, Cimbalistiene L, Utkus A, Ciuladaite Z, Preiksaitiene E, Pečiulytė A, Kučinskas V. Two new *de novo* interstitial duplications covering 2p14–p22.1: clinical and molecular analysis. *Cytogenet Genome Res*. 2013; 139(1):52-8.
8. Kalibataitė I, Rutkauskas V, Preikšaitienė E, Kučinskas V. Establishing genetic diagnosis of intellectual disability in children: diagnostic yield of various genetic approaches. *Acta medica Lituanica*. 2012(19-4): 409-415.
9. Kasnauskiene J, Ciuladaite Z, Preiksaitiene E, Matulevičienė A, Alexandrou A, Koumbaris G, Sismani C, Pepalytė I, Patsalis PC, Kučinskas V. A single gene deletion on 4q28.3: PCDH18 - A new candidate gene for intellectual disability? *Eur J Med Genet*. 2012 Apr; 55(4):274-7.
10. Čiuladaitė Ž, Preikšaitienė E, Kasnauskienė J, Utkus A, Cimbalistienė L, Matulevičienė A, Pečiulytė A, Ambrozaitytė L, Aleksišūnienė B, Dirsė V. Molekulinis kariotipavimas ir intelektinės negalios genetinės priežastys: klinikiniai atvejai. *Sveikatos mokslai*. 2012(1): 67-72.
11. Ciuladaitė Z, Kasnauskienė J, Cimbalistienė L, Preikšaitienė E, Patsalis PC, Kučinskas V. Mental retardation and autism associated with recurrent 16p11.2 microdeletion: incomplete penetrance and variable expressivity. *J Appl Genet*. 2011 Nov; 52(4):443-9.
12. Kasnauskiene J, Cimbalistiene L, Ciuladaite Z, Preiksaitiene E, Kučinskiene ZA, Hettinger J, Sismani C, Patsalis P.C, Kučinskas V. *De novo* 5q35.5 duplication with clinical presentation of Sotos syndrome. *Am J Med Genet A*. 2011 Oct; 155A(10):2501.

Žodiniai pranešimai:

1. Preikšaitienė E. Genominio variavimo fenomininės charakteristikos esant intelektinei negaliai. Lietuvos mokslų akademijos Biologijos, medicinos ir geomokslų skyriaus kasmetinė jaunųjų mokslininkų konferencija „Bioateitis: gyvybės ir geomokslų perspektyvos“, 2012.
2. Preikšaitienė E, Kučinskas V. Genetic diagnostic workflow for patients with intellectual disability. 11-asis Baltijos šalių laboratorinės medicinos kongresas, 2012.
3. Preikšaitienė E, Kasnauskienė J, Cimbalistienė L, Čiuladaitė Ž, Hettinger JA, Sismani C, Patsalis PC, Kučinskas V. *De novo* 5q35.3 duplikacija, lemianti Sotos sindromo klinikinį pasireiškimą. Lietuvos mokslų akademijos Biologijos, medicinos ir geomokslų skyriaus kasmetinė jaunųjų mokslininkų konferencija „Bioateitis: gyvybės ir geomokslų perspektyvos“, 2011.

Stendiniai pranešimai:

1. Preiksaitiene E, Molytė A, Ciuladaite Z, Kasnauskiene J, Utkus A, Kučinskas V. Phenomic clues to genomic variation in patients with developmental delay or intellectual disability. Europos žmogaus genetikos draugijos konferencija, 2013, Paryžius, Prancūzija.
2. Preiksaitiene E, Kasnauskiene J, Ciuladaite Z, Tumiene B, Patsalis PC, Kučinskas V. A second case of 7p22.1 microduplication: clinical and molecular characterization. Europos žmogaus genetikos draugijos konferencija, 2012, Niurnbergas, Vokietija.
3. Preikšaitienė E, Kasnauskienė J, Čiuladaitė Ž, Dirsė V, Cimbalistienė L, Utkus A, Matulevičienė A, Tumienė B, Magini P, Baptista J, Patsalis PC, Kurg A, Kučinskas V. Clinical features associated with submicroscopic chromosomal aberrations in patients with mental retardation/ developmental delay. Europos žmogaus genetikos draugijos konferencija, 2011, Amsterdamas, Nyderlandai.
4. Preikšaitienė E, Cimbalistienė L, Magini P, Kučinskas V. Mental retardation in a patient with 14q32.33 and 19p13.3 microdeletions characterized using array-based CGH. Europos žmogaus genetikos draugijos konferencija, 2010, Geteburgas, Švedija.

5. Liaugaudiene O, Ciuladaite Z, Kasnauskiene J, Preiksaitiene E, Cimbalistiene L, Kucinskas V. New critical region for recently defined 4q21 microdeletion syndrome. Europos žmogaus genetikos draugijos konferencija, 2013, Paryžius, Prancūzija.
6. Liaugaudienė O, Cimbalistienė L, Čiuladaitė Ž, Kasnauskienė J, Preikšaitienė E, Kučinskas V. *De novo* duplication 15q22.21-24.1 in patient with mental retardation, congenital heart defect and dysmorphic features. Europos žmogaus genetikos draugijos konferencija, 2012, Niurnbergas, Vokietija.
7. Čiuladaitė Ž, Utkus A, Kasnauskienė J, Preikšaitienė E, Pečiulytė A, Kučinskas V. A *de novo* interstitial deletion at 1p36.11 in a patient presenting with severe psychomotor delay, sensorineural hearing loss, congenital heart defect and dysmorphic features. Europos žmogaus genetikos draugijos konferencija, 2012, Niurnbergas, Vokietija.
8. Diršė V, Kasnauskienė J, Utkus A, Preikšaitienė E, Čiuladaitė Ž, Männik K, Kurg A, Kučinskas V. A *de novo* 1.8 Mb 17q21.33 microdeletion detected by SNP-CGH in patient with mental retardation and dysmorphic features. Europos žmogaus genetikos draugijos konferencija, 2011, Amsterdamas, Nyderlandai.
9. Kasnauskiene J, Čiuladaitė Ž, Preikšaitienė E, Hettinger J, Patsalis PC, Kučinskas V. *De novo* deletion 10p14 in patient with mental retardation, speech impairment and hypothyroidism. Europos žmogaus genetikos draugijos konferencija, 2011, Amsterdamas, Nyderlandai.
10. Kučinskas V, Dirse V, Utkus A, Preiksaitiene E, Männik K, Kurg A. Genome-wide detection of CNVs in Lithuanian patients with mental retardation. Amerikos žmogaus genetikos draugijos konferencija, 2010, Vašingtonas.

II. TYRIMŲ APŽVALGA

Nuo 1959 m., kai buvo nustatyta, kad 21 chromosomos trisomija lemia INN, iki pastarųjų metų progreso molekulinės citogenetikos ir molekulinės genetikos srityse išaiškinta daug skirtingų INN priežasčių, iš kurių dažniausia – chromosominė patologija. Pusė jų – mikrodelecijos ir mikroduplicacijos, kitaip vadinamos patogeniniais kopijų skaičiaus pokyčiais, aptinkamos molekulinio kariotipavimo metodais. Šių technologijų taikymas sveikos populiacijos tyrimams atskleidė, kad DNR kopijų skaičiaus pokyčiai sudaro 13 % žmogaus genomo. Tai esminis genomo variavimo šaltinis, atsakingas už žmogaus evoliuciją ir genetinę individų įvairovę. Tačiau retai pasitaikantys, dažniausiai *de novo* kilmės kopijų skaičiaus pokyčiai gali lemti CNS raidos ir funkcijos sutrikimus, tarp jų INN, autizmą, epilepsiją ir kai kurias psichikos ligas. Šių retų kopijų skaičiaus pokyčių patogeniškumui vertinti yra sudaryti diagnostiniai kriterijai, sukurtos duomenų bazės genotipo ir fenotipo duomenims saugoti bei vertinti. Atliekant molekulinio kariotipavo tyrimus pacientams, turintiems INN, nustatomi nauji mikrodeleciniai/ mikroduplicaciniai sindromai, patikslinama žinomų sindromų fenotipinių požymių įvairovė, išaiškinami juos lemiantys genai ar kritinių sindromui genų reguliacinės sritys.

2.1 INTELEKTINĖS NEGALIOS APIBRĖŽTIS IR KLASIFIKACIJA

Pagal Amerikos protinio atsilikimo asociacijos ir Amerikos psichiatrų asociacijos apibrėžtį, INN – žymiai mažesnė nei vidutinė protinė funkcija su adaptacinių įgūdžių ribotumu, pasireiškianti iki 18 metų amžiaus. Būdinga žymiai mažesnė nei vidutinė protinė funkcija ir 2 ar daugiau adaptacinių funkcijų sutrikimai, kuriems priskiriami bendravimo, apsitarnavimo, socialiniai ir tarpasmeniniai įgūdžiai, sveikatos ir saugumo, funkciniai akademiniai įgūdžiai, bendruomenės išteklių naudojimas, darbas ir laisvalaikis. Vaikams iki 5 metų apibūdinti vartojamas įvairiapusio raidos atsilikimo terminas. Jis apibrėžiamas kaip žymus atsilikimas dviejose ir daugiau sričių, įskaitant smulkią motoriką, kalbos suvokimą, ekspresyvią kalbą, bendrą motoriką, girdimąjį dėmesį ir atmintį, regimąjį dėmesį ir atmintį, savarankiškumą, socialinę adaptaciją.

Intelektinės negalios klasifikacijos pagrindas – intelekto koeficiento (IQ) nustatymas. Pagal jį skiriamas ribinis normalus intelektas (IQ 71-85), lengva intelektinė negalia (IQ 50-70), vidutinė (IQ 35-50) ir sunki (IQ <35).

Jei numanoma, kad INN priežastis yra genetinė, INN skirstoma į nesindrominę ir sindrominę. Esant sindrominei INN, pacientams būna kitų fizinių, elgesio ar neurologinių simptomų. Nesindrominiu atveju vienintelis klinikinis požymis yra INN. Tačiau nubrėžti ribą tarp šių dviejų kategorijų tampa vis sunkiau, kadangi vis dažniau nustatoma, kad skirtingos mutacijos tame pačiame gene gali sukelti tiek sindrominį, tiek nesindrominį protinį atsilikimą, pavyzdžiui, mutacijos *ARX*, *MECP2*, *FMRI* genuose.

2.2 KLINIKINĖS CITOGENETIKOS TECHNOLOGIJŲ RAIDA

Šiuolaikinės klinikinės citogenetikos eros pradžia siejama su Tjio ir Levan pranešimu 1956 metais (16), kad tikslus žmonių chromosomų skaičius yra 46, o ne 48, kaip manyta anksčiau. Po šios žinios per kelerius metus vieni paskui kitą identifikuoti chromosomų skaičiaus pokyčiai, susiję su specifiniais fenotipais. Dar 1959 m. Lejeune ir kt. paskelbus, kad papildoma maža akrocentrinė chromosoma nustatyta asmenims su *Down* sindromu (17), chromosominiai pokyčiai buvo susieti su INN etiologija. 1960 m. Patau (18) ir Edwards su kitais (19) atpažino sindromus, lemiamus atitinkamai 13 ir 18 chromosomų trisomijų. Vėliau šie sindromai pavadinti jų pavardėmis. Iki 1963 m. genetikai išaiškino, kad ne tik skaičiaus, bet ir struktūrinės chromosomų aberacijos, kaip chromosomų segmentų translokacijos ir delecijos, gali lemti dauginių raidos defektų sindromus ir INN. Pirmoji aprašyta chromosomų struktūrinė aberacija – 5 chromosomos trumpojo peties dalies delecija (20), lemianti *Cri du chat* sindromą. Tai buvo ir pirmasis struktūrinis chromosominis persitvarkymas, aprašytas Lietuvoje (21).

Tiksliau žmonių chromosomos identifikuotos nuo 1970 m., kai Caspersson su bendraautoriais sukūrė metodą žmonių chromosomų ruožuotumui išgauti, jas dažant fluorescenciniais dažikliais (22). Seabright (1972 m.) pademonstravo, kad chromosomų ruožuotumas gali būti gaunamas, veikiant tripsinu ir dažant Giemsa dažikliais (23). Buvo atrasti nauji žmogaus chromosomų tyrimo metodai,

pasižymintys didesne skiriamąja geba, palengvinantys subtilių genomo persitvarkymų nustatymą ir jų ryšį su fenotipo ypatumais. Mikroskopu matomi chromosominiai persitvarkymai, aptinkami atliekant standartinį kariotipo tyrimą, buvo nustatomi 10-15 % pacientų, turinčių sunkią INN (4).

1977 m. pradėjus taikyti DNR zondų *in situ* hibridizaciją su žmogaus chromosomomis, prasidėjo molekulinės citogenetikos era. Nors tradicine citogenetine chromosomų analize aptinkama daugelis chromosominių aberacijų, tačiau šiuo metodu negali būti pastebimi mažesni nei 3–5 milijonų bazių porų (Mb) segmentų persitvarkymai, kartais sunku nustatyti mažų papildomų žymeninių chromosomų kilmę, įvertinti kompleksines chromosomų aberacijas. Fluorescencinės *in situ* hibridizacijos (FISH) analizė padėjo įveikti kai kuriuos tradicinės citogenetikos trūkumus. Šiuo tyrimu, naudojant įvairių tipų zondus, metafazinėse chromosomose ir interfaziniame branduolyje nustatoma specifinių DNR segmentų lokalizacija ir skaičius. Analizė tikslinga tais atvejais, kai paciento klinikiniai požymiai būdingi tam tikram žinomos etiologijos sindromui (pvz., *Prader-Willi*, *Angelman*, *Williams* sindromams) arba jo kariotipe yra pakitimai, kuriuos būtina patikslinti (pvz., papildomai mažai, vadinamai žymenine, chromosomai identifikuoti). Tyrimo metu negaunama papildomos informacijos apie likusį genomą, todėl FISH metodu neaptinkamos aberacijos, kurios skiriasi nuo sukurtų zondų. Daugeliu atvejų gydytojo sprendimas tiesiogiai lemia zondų pasirinkimą diagnozei nustatyti, o diagnostinis šio tyrimo efektyvumas priklauso nuo pacientą konsultavusio gydytojo kompetencijos (24). Nuo 1990 m. pradėjus taikyti subtelomerinį FISH tyrimą, buvo nustatyta, kad nesubalansuoti subtelomeriniai persitvarkymai lemia 2,5-5 % INN atvejų (25, 26).

Pastaraisiais metais struktūrinių genomo pokyčių nustatymo technologijų progresas – visų pirma vLGH ir VNP-LGH metodais – suteikė galimybę aptikti submikroskopines delecijas ir duplikacijas (arba mikrodelecijas ir mikroduplikacijas) visame genome. Kelių didelių studijų duomenimis, patogeninės delecijos vLGH metodu nustatomos 5-15 % asmenų, turinčių INN (27, 28). Pritaikius molekulinio kariotipavimo tyrimus diagnostinėje praktikoje, submikroskopinių chromosominių pokyčių nustatymas pacientams, turintiems INN, žymiai išaugo. Šiais metodais identifikuojami du pagrindiniai mikrodelecijų bei mikroduplikacijų tipai –

pasikartojantys ir nepasikartojantys persitvarkymai. Abu jie svarbūs INN etiologijoje ir aptariami 2.3 dalyje.

2.3 ŽMOGAUS GENOMO STRUKTŪRINIAI POKYČIAI

2.3.1 Apibrėžtis, reikšmė

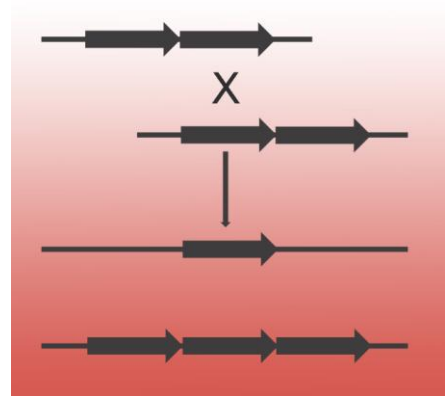
XX a. paskutiniame ketvirtyje žmonių genetinė įvairovė buvo siejama su heterochromatino polimorfizmais, matomais šviesiniu mikroskopu, ir vieno nukleotido polimorfizmais (VNP), aptinkamais DNR sekoskaitos metodu. Naujos technologijos, tokios kaip vLGH bei VNP-LGH, suteikiančios galimybę detalizuoti genominių pokyčių dydį ir poziciją visame genome, padeda nustatyti, kad lyginant su referentine žmogaus genomo seka, dideli mūsų genomų segmentai yra iškritę arba padvigubėję (29). Šie segmentai vadinami genominės DNR kopijų skaičiaus pokyčiais, o jų dydis varijuoja nuo 1 kilobazės (kb) iki megabazių (Mb) (30).

Pirmąjį kopijų skaičiaus pokyčių planą sudarė Redon ir kiti (31). Jame matyti, kad tiek artimų giminaičių, tiek skirtingų populiacijų žmonių genomams būdinga didelio laipsnio struktūrinė įvairovė, kurios pagrindas – genominių segmentų delecijos ir duplikacijos. Redon ir kiti DNR kopijų skaičiaus pokyčius identifikavo 1400 regionų, apimančių apie 13 % žmogaus genomo ir 14,5 % su ligomis siejamų genų (manoma, nejautrių dozei). Prieita išvados, kad šie kopijų skaičiaus pokyčiai yra suderinami su sveikata, svarbūs, tačiau labai nespecifiniai fenotipui. Kiekvieno iš mūsų genomai pilni kopijų skaičiaus pokyčių: atlikus aukštos skiriamosios gebos molekulinį kariotipavimą, kiekvienam identifikuojama 600-900 kopijų skaičiaus pokyčių (32). Juose yra 2-3 kartus daugiau nukleotidų, nei jų skaičiuojama vieno nukleotido bazių pakaitose lyginant skirtingus genomus.

Tiksli informacija apie kopijų skaičiaus pokyčių poziciją, dydį, bendrą skaičių ir pasiskirstymą populiacijoje vis dar nėra žinoma. Neabejojama, kad šie struktūriniai submikroskopiniai DNR kopijų skaičiaus pokyčiai yra esminis genominio varijavimo šaltinis. Būtent kopijų skaičiaus pokyčiai, o ne VNP, labiau siejami su žmogaus evoliucija, genetinė individų įvairove ir susirgimais paveldimomis ligomis (32).

2.3.2 Susidarymo mechanizmai

Kopijų skaičiaus pokyčius gali lemti delecijos, duplikacijos, triplikacijos, insercijos ir translokacijos. Iki 5 % referentinio haploidinio žmogaus genomo yra po dvi ar tris kopijas. Didesni nei 1 kb ir daugiau nei 90 % identiški DNR fragmentai yra vadinami segmentinėmis duplikacijomis. Ilgesnės nei 10 kb segmentinės duplikacijos gali būti susijusios su lokaliu genominiu nestabilumu. Dėl savo didelio sekų homogeniškumo, segmentinės duplikacijos gali būti nesutapimo ir dėl to sekančios nealelinės homologinės rekombinacijos



2.1 pav. Dėl segmentinės duplikacijos įvykusi NAHR lemia deleciją arba duplikaciją.

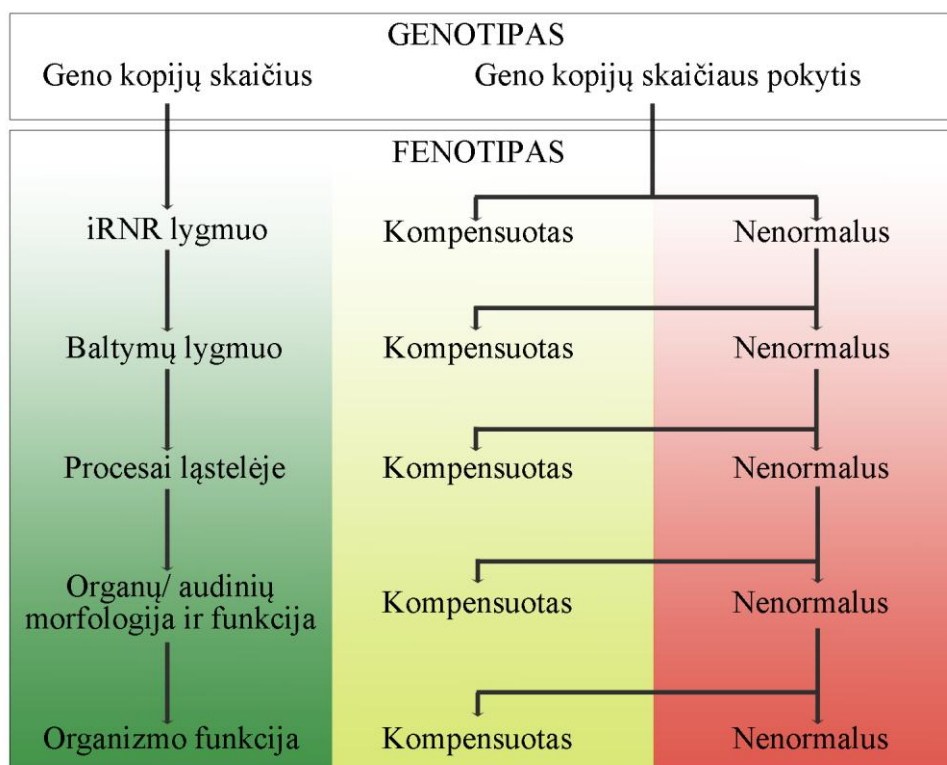
(NAHR) priežastimi mejozės metu (2.1 pav.). Šis mechanizmas lemia daugiausia pasikartojančių chromosominių persitvarkymų: tokių, kurie yra panašūs savo dydžiu, trūkio taškais ir dažnai pasitaiko skirtinguose individuose.

Kartais NAHR gali vykti dalyvaujant didelio homogeniškumo pasikartojančioms sekoms (*Alu*, *LINE*). Tokia NAHR dažniau lemia nepasikartojančius chromosominius persitvarkymus (33). Egzistuoja ir kiti mechanizmai, nesusiję su segmentinėmis duplikacijomis, kuriais formuojasi kopijų skaičiaus pokyčiai, pavyzdžiui, nehomologinis galų sujungimas, replikacijos klaidos ir kiti (34).

2.3.3 Patogeniškumo kriterijai

Dauguma kopijų skaičiaus pokyčių yra nepatogeniniai – 9 iš 10 žmonių turi didesnę nei 1 kb chromosominę kopijų skaičiaus pokytį (35). Kai kuriais atvejais jie nėra kliniškai reikšmingi, kiti specifiniai pakitimai gali būti susiję su Mendelinio paveldėjimo ligomis, polinkiu sirgti daugiaveiksnėmis ligomis ir organizmo atsaku vaistams (36), tačiau dažniausiai jų pasekmės nėra žinomos. Kopijų skaičiaus pokyčio patogeniškumas vertinamas, atsižvelgiant į Rosenberg ir Lee apibrėžtus patogeniškumo kriterijus (37, 38): kilmę (paveldėtas ar *de novo*), persidengimą su polimorfiniais regionais ir žinomais ligą lemiančiais kopijų skaičiaus pokyčiais,

persitvarkymo dydį, genų skaičių jame bei pokyčio pobūdį (delecija ar duplikacija). Patogeniniai kopijų skaičiaus pokyčiai dažniau būna *de novo* kilmės, nepersidengiantys su polimorfiniais regionais (esančiais duomenų bazėje *Database of Genomic Variants*), persidengiantys su žinomais ligą lemiančiais chromosominiais pokyčiais (pateiktais *DECIPHER* arba *ECARUCA* duomenų bazėse), apimantys ligos genus (aprašytus *OMIM* duomenų bazėje). Be to, delecijų patogeniškumas yra didesnis nei duplikacijų, o didesni pokyčiai, tikėtina, yra labiau patogeniniai nei mažesni.



2.2 pav. Kelias nuo genų kopijų skaičiaus pokyčio iki ligos. Neatmetama galimybė, kad kiekviename etape yra kompensaciniai mechanizmai, padedantys išvengti fenotipinių pokyčių.

Kopijų skaičiaus pokytis gali lemti pozicijos efektą, atskleisti recesyvinę mutaciją, pašalinti reguliacinius elementus ar tiesiog pertraukti koduojančią DNR seką (34). Tačiau poveikis fenotipui labiausiai priklauso nuo to, ar pokytyje yra dozei jautrių genų. Tai tokie genai, dėl kurių kopijų skaičiaus pokyčių pasireiškia tam tikra išmatuojama klinikinė pasekmė. Manoma, kad jautrūs dozei genai sudaro 5-10 % visų genų. Pavyzdžiui, *Smith-Magenis* sindromą dažniausiai lemiančioje delecijoje yra 52 genai, tačiau iš jų vienintelis *RAI1* genas yra atsakingas už 21 iš 30 sindromui būdingų

klinikinių požymių. Taigi šiame genomo regione iš 52 genų tikriausiai yra tik 3 ar 4 (~6 %) dozei jautrūs genai, o esant delecijai, pasireiškia jų haplonepakankamumas, lemiantis specifinį sindromui fenotipą (39). Tačiau kelias nuo genotipo iki ligos yra daugiapakopis ir kiekviename lygmenyje galimi įvairūs kompensaciniai mechanizmai (2.2 pav.). Informacija apie dozei jautrius genus ir kompensacinių mechanizmų ypatumus gali padėti sukurti molekulinį pagrindą chromosominėms ligoms gydyti. Taigi dozei jautrių genų nustatymas yra svarbus pereinant nuo citogenetinio identifikavimo iki chromosominės aberacijos molekulinio supratimo (35).

2.3.4 Įtaka CNS raidos ir funkcijos sutrikimams

Pastarųjų metų tyrimų duomenimis, retai pasitaikantys, dažniausiai *de novo* kilmės (arba segreguojantys su liga šeimoje) kopijų skaičiaus pokyčiai yra siejami su CNS raidos ir funkcijos sutrikimais, tarp jų INN, autizmu, epilepsija ir kai kuriais kitais psichikos sutrikimais (40-42). Pastebėta, kad šie reti *de novo* kopijų skaičiaus pokyčiai lemia žymią dalį INN atvejų, gali būti bet kur genome ir įvairuoja savo dydžiu. Lyginant su kontroline grupe, pacientų, turinčių INN, patogeniniuose kopijų skaičiaus pokyčiuose yra daugiau genų, siejamų su specifiniais CNS fenotipais (7).

Liang ir kitų duomenimis (43) vidutinis molekulinio kariotipavimo diagnostinis efektyvumas pacientams, turintiems INN, ir normaliu kariotipo tyrimo rezultatu – vidutiniškai 5-15 %. Tyrėjai taip pat nurodo, kad patogeniniai kopijų skaičiaus pokyčiai dažniau nustatomi pacientams, kurių INN yra sunki ir lydima raidos defektų ar dismorfinių požymių. Vermeesch (13) duomenimis, patogeninių struktūrinių chromosominių pokyčių aptikimas didėja molekulinio kariotipavimo tyrimams naudojant didesnės skiriamosios gebos genominius lustus: atliekant aukštos skiriamosios gebos molekulinio kariotipavimo tyrimus, 20 % aptiktų chromosominių pokyčių yra mažesni nei 1 Mb, o tai rodo, kad didesnės skiriamosios gebos tyrimai pagerins molekulinio kariotipavimo diagnostinį efektyvumą, tačiau neabejotinai apsunkins rezultatų interpretavimą, kadangi atskirti patogeninį pokytį nuo normalaus kopijų skaičiaus pokyčio esant tokio lygio skiriamajai gebai yra sudėtinga.

Daugumai pacientų, turinčių INN, identifikuojamas genomo struktūrinis pokytis, kuris neatitinka monogeninio sindromo arba kitos žinomos būklės,

pavyzdžiui, anksčiau aprašytų mikrodelecinių/ mikroduplikacinių sindromų kriterijų. Šių naujų kopijų skaičiaus pokyčių neįmanoma diagnozuoti kliniškai bei patvirtinti taikant specifinius tyrimo metodus (FISH, SLŽA ar konkrečios srities sekoskaitos). Šiais atvejais tikslingiausias viso genomo skenavimas naudojant molekulinio kariotipavimo technologijas. Tai aiškiai rodo viso genomo patikros metodų (taip pat ir egzomo bei genomo sekoskaitos) būtinybę.

2.4 CHROMOSOMINIŲ POKYČIŲ FENOMIKA

Sindrominės INN fenomika sudėtinga dėl plačios ją lydinčių fenotipinių požymių įvairovės. Autosominėms chromosominėms aberacijoms be INN (kuri yra dažniausias požymis) taip pat būdingas intrauterinis ir postnatalinis augimo sulėtėjimas, dismorfiniai požymiai bei raidos defektai (paprastai dauginiai).

Daugumos autosominių chromosominių aberacijų pagrindinis požymis – specifiniai dismorfiniai požymiai. Dažniausiai jie stebimi veide, galūnių distalinėse dalyse ir lytiniuose organuose. Mikroanomalijos gali pasireikšti dėl neproporcingo augimo fetogenezės laikotarpiu (pvz., ausų dydžio ir pozicijos pokyčiai) arba atspindėti vidaus organų raidos defektus, nepastebimus apžiūros metu (pvz., hipotelorizmas, vienas centrinis kandis, nosies pertvaros defektas charakteringas holoprozencefalijai). Dismorfinių požymių visuma būdingesnė autosominei chromosominei aberacijai nei vienas dismorfinis požymis, tačiau dismorfinio vaizdo apibūdinimui svarbus fenotipinių pokyčių standartizavimas (44).

Chromosominės etiologijos sindrominiams INN negalios atvejams būdingi įvairūs vidaus organų raidos defektai, iš kurių vienas ar kitas defektas gali būti ypatingai dažnas esant konkrečiam chromosominiam pokyčiui. Kai kurie raidos defektai ypatingai dažnai pasitaiko esant autosominėms chromosomų aberacijoms (pvz., stemplės atrezija, omfalocelė, inkstų ir šlapimo sistemos raidos defektai, kai kurios galvos smegenų anomalijos, mikroftalmija), o kiti chromosominiams pokyčiams nebūdingi (pvz., anencefalija, sirenomelija, teratoma, įgimta artrogripozė). Atspindėdamos sunkesnę ir retesnę variavimo ribą, įgimtos anomalijos būna rečiau esant tam tikrai chromosominei aberacijai nei dismorfinių požymių visuma (45).

Tobulėjant chromosominių pokyčių identifikavimo technologijoms, genotipinės aberacijos gali būti koreliuojamos su fenotipinėmis anomalijomis. Southard ir kitų autorių duomenimis (46), galimi patogeniniai DNR kopijų skaičiaus pokyčiai žmogaus genome nustatomi pacientams su izoliuotomis struktūrinėmis įgimtomis anomalijomis bei aptinkamos pastarųjų sąsajos su specifiniais genomo regionais. Pavyzdžiui, mutacijos *SIMO1*, *PAFAH1B1*, *NSD1* ir *RUNX2* genuose lemia izoliuotus kraniofacialinius defektus, *COUP-TFII* geną apimančios delecijos susijusios su įgimta diafragmos išvarža.

Akcentuotinas ir pacientų individualumas. Vienodų mutantinių alelių keliuose pacientuose raiška vyksta skirtinguose (unikaliuose) genomuose, todėl ir jų lemiamas fenotipas gali būti unikalus. Ilgalaikei išeičiai įtakos turi ir aplinkos veiksniai. Weatherall (47) pabrėžė, kad kiekviena liga, kurią lemia genetinis defektas, tam tikra prasme yra sudėtinis genetinis sutrikimas, kadangi kiti genai ir aplinka daro įtaką fenotipui.

2.5 DUOMENŲ BAZIŲ NAUDOJIMAS GENOTIPO-FENOTIPO RYŠIUI NUSTATYTI

Patogeniniai žmogaus genomo kopijų skaičiaus pokyčiai, kurie paprastai yra didesni nei nepatogeniniai ir *de novo* kilmės, vis dažniau siejami su konkrečiomis ligomis. Molekulinio kariotipavimo dėka anksčiau neidentifikuoti genominiai persitvarkymai dabar gali būti koreliuojami su fenotipinėmis anomalijomis (46). Pacientų fenotipavimas iki šiol yra sudėtingiausias ir vis dar neišspręstas uždavinys žmogaus genetikoje. Norint nustatyti, kurie genai jautrūs dozei, būtų idealu fenotipuoti asmenis su viena geną apimančiais kopijų skaičiaus pokyčiais, tačiau tai neįmanoma dėl tokių pokyčių retumo (35).

Kadangi mikrodelecijų/ mikroduplikacijų nustatymas visame genome yra gana naujas diagnostinis įrankis, tikėtina, kad pacientams, turintiems INN, aptinkami nauji (anksčiau neaprašyti) bei reti patogeniniai kopijų skaičiaus pokyčiai bus nustatomi ir ateityje. Kopijų skaičiaus pokyčių patogeniškumui vertinti svarbios duomenų bazės, kuriose genotipo duomenys pateikiami kartu su detaliu pacientų, turinčių INN, fenotipo aprašymu. Taigi pacientų su INN ir retais chromosominiais pokyčiais

genotipo-fenotipo asociacijų katalogavimui buvo sukurta *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources* (DECIPHER) duomenų bazė, kurios tikslas – padėti identifikuoti pacientų grupes su INN ir panašiais fenotipiniais požymiais ar genominiiais pokyčiais (48). 2004 metais, sukūrus šią duomenų bazę, DECIPHER tapo svarbiu tarptautiniu šaltiniu, kuriame kaupiama daugiau nei 17 000 pacientų fenotipinių požymių ir chromosominių pokyčių informacija (49). Naudodamiesi DECIPHER duomenų baze, viso pasaulio tyrėjai į ją gali įkelti paciento genominius ir fenotipo duomenis, identifikuoti chromosominiame persitvarkyme esančius genus, interpretuoti įkeltus duomenis lyginant juos su kitų pacientų genominiiais ir fenotipiniais duomenimis, kurie yra sukaupti DECIPHER duomenų bazėje. Tai skatina gydytojų genetikų ir molekulinį citogenetikų tarptautinį bendradarbiavimą ir palengvina naujų sindromų bei genų funkcijų identifikavimą. Įkelti ir dalintis pacientų citogenetinėmis duomenimis taip pat suteikia galimybę ir kitos pasaulinės iniciatyvios organizacijos, pvz., *International Standards for Cytogenomic Arrays* (ISCA) konsorciumas (50) ir *European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations* (ECARUCA) (51).

2.6 NAUJI MIKRODELECINIAI/ MIKRODUPLIKACINIAI SINDROMAI

Atliekant viso genomo molekulinis citogenetinius tyrimus, pacientams, turintiems INN, identifikuojama daug naujų patogeninių kopijų skaičiaus pokyčių. Kruopščios genotipo-fenotipo ryšio analizės pagrindu nustatant kelių pacientų su persidengiančiais patogeniniais kopijų skaičiaus pokyčiais asociacijas su šiemis pacientams bendrais klinikiniais požymiais, identifikuojami nauji mikrodeleciniai/mikrodupliaciniai sindromai (12) (2.1 lent.).

Anksčiau genotipo-fenotipo ryšio analizė buvo atliekama „pirma fenotipas“ principu, t. y. pirmiausia detalizuojant pacientų grupės su panašiais klinikiniais požymiais fenotipą, o po to identifikuojant šiemis pacientams bendrą (panašų) chromosominį pokytį (52). Pastaruoju metu chromosominių pakitimų nustatymas yra nesunkiai atliekamas taikant molekulinio kariotipavimo metodus ir yra tikslesnis nei bet kada anksčiau. Dėl to naujų sindromų identifikavimo pradinis taškas gali būti persidengiančių chromosominių pokyčių identifikavimas, tai vadinama „pirma

2.1 lentelė. Autosominiai mikrodeleciniai/ mikroduplicaciniai sindromai (DECIPHER, 2012 lapkričio mėn. duomenimis).

Chromosoma, sindromas	Chromosoma, Sindromas
1, 1p36 mikrodelecijos s.	15, 15q24 pasikartojančios mikrodelecijos s.
1, 1q21.1 pasikartojanti mikrodelecija	15, 15q26 pagreitėjusio augimo s.
1, 1q21.1 pasikartojanti mikroduplicacija	15, Angelman s. (1 tipas)
1, 1q21.1 sr. polinkiu trombocitopenijos -stipinkaulio nebuvimo s.	15, Angelman s. (2 tipas)
2, 2p15-16.1 mikrodelecijos s.	15, Prader-Willi s. (2 tipas)
2, 2p21 mikrodelecijos s.	15, Prader-Willi s. (1 tipas)
2, 2q33.1 delecijos s.	16, 16p11.2 mikroduplicacijos s.
2, 2q37 monosomija	16, 16p11.2-p12.2 mikrodelecijos s.
3, 3q29 mikrodelecijos s.	16, 16p13.11 pasikartojanti mikrodelecija
3, 3q29 mikroduplicacijos s.	16, 16p13.11 pasikartojanti mikroduplicacija
4, Wolf-Hirschhorn s.	16, ATR-16 s.
5, Suaugusių AD leukodistrofija	16, Rubinstein-Taybi s.
5, Cri du Chat s. (5p delecija)	17, 17q21.31 pasikartojančios mikrodelecijos s.
5, Šeiminė adenomatozinė polipozė	17, Charcot-Marie-Tooth s. 1A tipas (CMT1A)
5, Sotos s.	17, Paveldima neuropatija su polinkiu suspaudimo paralyžiui
7, 7q11.23 duplikacijos s.	17, Miller-Dieker s.
7, Plaštakos/pėdos ektradaktilija 1	17, NF1-mikrodelecijos s.
7, Williams-Beuren s.	17, Potocki-Lupski s. (17p11.2 duplikacijos s.)
8, 8p23.1 delecijos s.	17, RCAD (inkstų cistos ir diabetas)
8, 8p23.1 duplikacijos s.	17, Smith-Magenis s.
8, 8q21.11 mikrodelecijos s.	21, Ankstyvos pradžios Alzheimer liga su smegenų amiloidine angiopatija
9, 9q subtelomerinės delecijos s.	22, 22q11 delecijos s. (DiGeorge s.)
11, Potocki-Shaffer s.	22, 22q11 duplikacijos s.
11, WAGR 11p13 delecijos s.	22, 22q11.2 distalinės delecijos s.
12, 12p13.33 mikrodelecijos s.	22, 22q13 delecijos s. (Phelan-Mcdermid s.)
12, 12q14 mikrodelecijos s.	22, Katės akių s. (I tipas)
15, 15q13.3 mikrodelecijos s.	

genotipas“ metodu (53). Šiuo būdu atrenkami pacientai su panašiomis chromosominėmis aberacijomis dar prieš apibrėžiant jiems bendrus klinikinius požymius. Tai sėkmingas naujų mikrodelecinių/ mikroduplikacinių sindromų nustatymo metodas.

2.7 PATOGENINIŲ KOPIJŲ SKAIČIAUS POKYČIŲ REIKŠMĖ, NUSTATANT CNS RAIDAI IR FUNKCIJAI SVARBIUS GENUS

Be naujų mikrodelecinių/ mikroduplikacinių sindromų nustatymo, aukštos skiriamosios gebos molekulinio kariotipavimo tyrimai gali būti naudingi identifikuojant ligos genus. Tikslus su INN siejamų genų skaičius kol kas nežinomas. 10-12 % genų X chromosomoje siejami su INN. Taigi jei X chromosomą galima naudoti kaip genomo modelį, tikėtina, kad minimalus autosominių INN genų skaičius yra 800-850 (3), o kitų autorių duomenimis (11), apie 2000 genų gali lemti INN monogeniniu ligos modeliu. CHARGE yra pirmasis sindromas, kurio genetinis pagrindas išaiškintas šiuo būdu (54). Poot ir kitų apžvalgos duomenimis, molekulinis kariotipavimas gali būti rezultatyvus sindromą lemiančių genų identifikavimui, kai liga pasireiškia dėl geno haplonepakankamumo (55). Su autosominiu recesyviniu paveldėjimu susiję genai gali būti reikšmingi tuo atveju, jei delecija atskleidžia mutaciją kitame geno alelyje. Vertinant genų reikšmę fenotipui, atsižvelgiama ir į genų raiškos ypatumus – CNS raidos sutrikimams turėtų būti reikšmingi tie genai, kurių raiška vyksta CNS raidos laikotarpiu (56).

Mikhail ir kiti (57) atkreipia dėmesį į mažus (<500 kb) patogeninius kopijų skaičiaus pokyčius, apimančius tik vieną geną arba dalį geno, svarbaus CNS raidos ar funkcionavimo procesuose. Jie ypatingai reikšmingi kandidatiniams INN genams identifikuoti, be to, maži patogeniniai kopijų skaičiaus pokyčiai gali susiaurinti didelių patogeninių chromosominių pokyčių už fenotipines pasekmes atsakingas kandidatines sritis. Tyrėjai kelia mintį, kad normali kognityvinė funkcija ir elgesys priklauso nuo glaudžių neuronų homeostazės kontrolės mechanizmų. Neuronų homeostazei svarbių genų dozės pokyčiai gali sutrikdyti neuroninius tinklus, normalią smegenų raidą bei lemti įvairius elgesio ir neurologinius fenotipus (58). Funkciškai dauguma šių genų gali būti priskirti vienai iš penkių kategorijų: neuroninių transkripcijos veiksnių genai

bei sinapsių formavimosi ir išlaikymo, baltymų ubikvitinimo, chromatino remodeliavimo ir neurotransmisijos procesuose dalyvaujančius baltymus koduojantys genai (58, 59). Tačiau nėra vieno raktinio, bendro kelio, kurio sutrikdymai lemėtų INN. Aiškėja, kad kognityvinius sutrikimus gali lemti beveik bet kuriame ląstelėje vykstančiame biologiniame procese dalyvaujančių baltymų koduojančių genų pokyčiai. Tai rodo, kad INN yra dėl įvairių nespecifinių priežasčių funkciškai neaktyvių neuronų galutinis pasireiškimas.

Dauguma iki šiol identifikuotų genų sąveikauja arba jungiasi per šiuo metu dar nežinomas molekules. Suprantant kiekvieno komponento biologinės sąveikos ryšius tinkluose, INN lemiančių raktinių genų ir anomalijų identifikavimas leidžia numanyti kitų genų, kurie galėjo būti susiję su INN, funkcinę svarbą. Ilgėjant žinomų INN genų sąrašui ir aiškėjant šių genų funkcijoms, atrandami kiti tiesiogiai sąveikaujantys genai ir nustatomi jų ryšių keliai (4).

Nėra paprasta įrodyti, kad identifikuotų specifinių genų mutacijos iš tiesų lemia INN. Vienam pacientui, turinčiam INN, nustatyta geno delecija nebūtinai yra įrodymas, kad šis genas susijęs su kognityviniais sutrikimais. Tik pakartotinai aptikus persidengiančius patogeninius sekos pokyčius skirtingiems pacientams, turintiems INN, ir neradus tokių pokyčių didelėje kontrolinėje grupėje, genas gali būti patikimai susietas su INN fenotipu (60).

Apibendrinimas

Žmogaus genomo projektas, iššifravęs žmogaus branduolio DNR nukleotidų seką, iškelė naujus uždavinius, parodydamas, kad kelias nuo genotipo iki fenotipo yra gerokai sudėtingesnis nei manyta anksčiau. Technologijų progresas ir molekulinio kariotipavimo taikymas diagnostikoje suteikė vertingų žinių apie DNR kopijų skaičiaus pokyčių klinikinę reikšmę. Nustatyta, kad chromosominiai pokyčiai yra dažniausia šiuo metu žinoma INN priežastis. Genomo patogeninės mikrodelecijos ir mikroduplicacijos gali suardyti neurogeninius kelius ir lemti kognityvinės funkcijos sutrikimus bei dismorfinius požymius ir/ ar įgimtus raidos defektus. Kadangi daugelis nustatomų chromosominių pokyčių yra reti ar net unikalūs, kiekvieno paciento, turinčio nežinomos kilmės INN, išsamus genetinis ištyrimas gali atskleisti naujas INN genetines priežastis. Šis darbas ir skirtas tam, kad ištyrus Lietuvos pacientų, turinčių

nežinomos etiologijos INN, imtį ir atlikus tiriamųjų genominių ir fenotipinių duomenų analizę, būtų gauta išsamesnė informacija apie patogeninių kopijų skaičiaus pokyčių lemiamus fenotipinius požymius, nustatyti nauji dozei jautrūs INN genai kandidatai, žinomų genų reguliacinės sritys. Šios žinios yra būtinos, norint suprasti ir gydyti genetines ligas.

III. DARBO METODOLOGIJA

Mokslinis darbas vykdytas 2011–2013 m. laikotarpiu, mokslinių projektų CHERISH („Protinio atsilikimo diagnostikos gerinimas vaikams iš Rytų Europos ir Centrinės Azijos, taikant genetinį apibūdinimą ir bioinformatiką/statistiką“ finansuojamas Europos Sąjungos 7 programos [FP7/2007-2013], sutarties Nr. 223692) ir PROGENET („Patogeninių kartotinių sekų reikšmė protinio atsilikimo etiopatogenezeje“, finansuojamas Lietuvos mokslo tarybos pagal Nacionalinę programą „Lėtinės neinfekcinės ligos“, sutarties Nr. LIG-12/2010) veiklos kryptių pagrindu. Pacientų, turinčių INN, iš Lietuvos molekuliniai citogenetiniai ir molekuliniai genetiniai tyrimai buvo atlikti Vilniaus universiteto Žmogaus ir medicininės genetikos katedros (VU ŽMGK), Tartu universiteto (UTARTU), Kipro neurologijos ir genetikos instituto (CING) bei Alma Mater Studiorum – Bolonijos universiteto (UNIBO) tyrėjų komandų. Mokslinis tyrimas atliktas laikantis asmens duomenų apsaugos ir bioetikos reikalavimų. Gautas Vilniaus regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto leidimas – pritarimas leidimo papildymui Nr. 158200-6-057-067LP1, kuriuo buvo patvirtintos asmens informavimo forma ir sutikimo forma paciento tėvams/teisėtiems atstovams (I priedas).

3.1 PIRMOJO DARBO UŽDAVINIO VYKDYMO EIGA IR METODAI

3.1.1 Pacientų atranka tyrimui

Tyrimui atrinkti pacientai iš Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikos (VUL SK) Medicininės genetikos centro (MGC) 2006–2010 m. klinikinės duomenų bazės, ir 2010–2011 m. pirmą kartą MGC konsultuotų pacientų, kuriems nustatyta diagnozė (koduota TLK-10 ligų klasifikacijos kodais) F70, F71.0, F71.1, F72, F72.0, F75.2, F80.0, F83, F84, F84.0, F84.5, F84.8, G31.8, G31.9, G40, G40.0, G40.2,

G40.3, G40.4, G40.8, G40.9, Q02, Q03, Q03.1, Q03.8, Q04.0, Q04.2, Q04.3, Q04.6, Q04.8, Q87.0, Q87.1, Q87.2, Q87.3, Q87.5, Q87.8, Q89.7, Q89.8, Q89.9, Z03.0, Z03.8, Z03.9, Z13.5, Z13.7, Z13.8 arba Z13.9. Pagal šias diagnozes sudarytas 1223 pacientų sąrašas, iš kurių buvo parinkti asmenys, atitinkantys standartizuotus mokslinio tyrimo pacientų atrankos kriterijus.

Konsultuojantis su CHERISH projekto konsorciumo nariais, buvo sudaryti standartizuoti pacientų atrankos kriterijai. Pagrindinis iš jų – protinis atsilikimas (vertinant Vekslerio testu, $IQ < 70$) arba raidos atsilikimas (< 6 m. amžiaus vaikams, vertinant Denverio ar kitu testu).

Kitos indikacijos tyrimui:

- Įtariamas žinomas INN sindromas, kurio genetinė etiologija nežinoma,
- Anksčiau neaprašytas dauginių raidos defektų/INN sindromas,
- Nežinomos genetinės priežasties struktūrinės įgimtos galvos smegenų anomalijos,
- Nežinomos etiologijos neurologiniai sindromai (cerebrinis paralyžius, sunki epilepsija) ir INN,
- Autizmas ir INN.

Būtinios pacientų įtraukimo į tyrimą sąlygos:

- Atmestas aplinkos veiksnių poveikis (anamnezės, objektyvaus tyrimo esant indikacijoms – instrumentinių ir laboratorinių tyrimų duomenimis) kaip etiologinis INN veiksnys,
- Nenustatyta genetinė INN priežastis atlikus rutinius genetinius tyrimus (standartinis kariotipas, lūžiosios X chromosomos sindromo molekulinė diagnostika (berniukams) esant indikacijoms – biocheminė genetinė paveldimų medžiagų apykaitos sutrikimų diagnostika),
- Paciento šeima sutinka dalyvauti tyrime.

Peržiūrėjus sudaryto pacientų sąrašo ($n=1223$) ambulatorines korteles, vadovaujantis numatytais pacientų atrankos kriterijais, molekulinio kariotipavimo tyrimams atrinkti 357 pacientai. Atrinktų pacientų šeimos buvo kviečiamos pakartotinei genetinei konsultacijai telefonu arba siunčiant laiškus paštu. Į konsultaciją

atvyko 266 šeimos. Moksliniam darbui atrinkta 211 šeimų, atitikusių atrankos kriterijus ir sutikusių dalyvauti tyrime.

Iš darbo metu tirtų 211 pacientų, 148 tiriamieji buvo vyriškos lyties, 63 – moteriškos. 181 pacientas turėjo sindrominę INN, t. y. be INN stebėti fiziniai pokyčiai (dismorfiniai požymiai ir/ arba įgimtos anomalijos), neurologiniai ar elgesio sutrikimai. 30 pacientų INN buvo nesindrominė, kai stebėtas vienintelis patologinis požymis – INN.

Norint įvertinti nustatytų probandams kopijų skaičiaus pokyčių kilmę, į tyrimą taip pat buvo įtraukti ir tėvai. Esant būtinybei, buvo atliekama segregacijos analizė, papildomai tiriant paciento sibsus, II ir III eilės giminaičius. Tyrime dalyvavo 205 pacientų motinos ir 196 pacientų tėvai (196 triados) bei 44 kiti giminaičiai.

3.1.2 Klinikinių duomenų ir DNR rinkimas

Pacientų klinikinių duomenų rinkimui dalyvaujant CHERISH konsorciumo gydytojų genetikų komandai, buvo sudaryti standartizuoti klausimynai, ypatingą dėmesį skiriant šeimos istorijai ir genealogijai, anamnezei, objektyviam ištyrimui, atliktiems vaizduojamiesiems ir laboratoriniams tyrimams (II priedas). Genetinių konsultacijų metu buvo pildomi klausimynai, pasirašomos sutikimo dalyvauti moksliniame tyrime formos, imamas paciento, jo tėvų, jei įmanoma – sibsų ir kitų giminaičių kraujas DNR išskyrimui. Klinikiniai duomenys iš klausimynų ir ambulatorinių kortelių buvo suvesti į CARTAGENIA duomenų bazę. Surinkta 211 probandų, 205 motinų, 196 tėvų ir 44 kitų giminaičių periferinio kraujo ėminių. DNR išskirta VU ŽMGK darbuotojų fenolio chloroformo metodu pagal VUL SK MGC Molekulinės genetikos laboratorijoje patvirtintą metodiką.

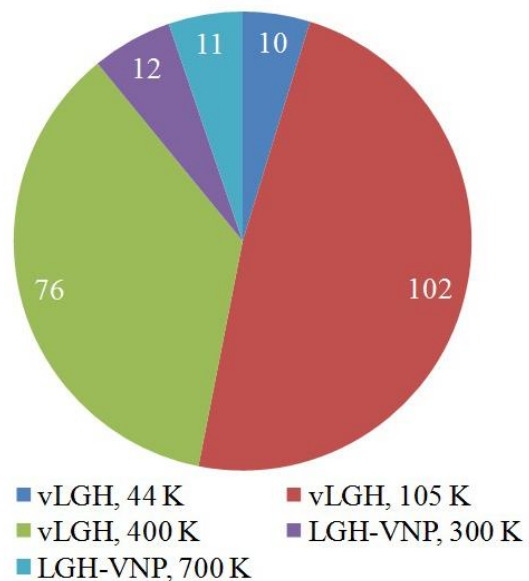
3.1.3 Molekulinis kariotipavimas

Molekulinis kariotipavimas atliktas 211 probandų, 76 motinoms ir 76 tėvams, didžiajai daliai tiriamųjų (201 iš 211) naudojant didelės skiriamosios gebos technologijas (3.1 pav.). Tyrimus atliko VU ŽMGK molekulinės citogenetikos specialistai, kurie bendradarbiavo su UTARTU, CING ir UNIBO mokslininkais. Tyrimų rezultatų analizę atliko VU ŽMGK tyrėjai. Molekulinis kariotipavimas VNP-LGH metodu (Illumina, JAV), padedant UTARTU mokslininkams, atliktas 23

pacientams, iš jų 12 naudojant 300 K, 11 pacientų tirti naudojant 700 K lustus. vLGH tyrimas (Agilent, JAV) atliktas 188 pacientams:

- bendradarbiaujant su UNIBO tyrėjais, 10 pacientų tirti buvo naudojami 44 K vLGH lustai,
- 181 pacientui (ir 152 tėvams) atlikti didelės skiriamosios gebos vLGH tyrimai, iš jų 105 pacientams – naudojant 105 K, 76 pacientams ir jų tėvams – 400 K lustų sistemas. Tyrimai atlikti bendradarbiaujant su CING mokslininkais.

Molekulinio kariotipavimo tyrimai atlikti vadovaujantis gamintojų rekomendacijomis. Gautų duomenų analizė atlikta VU ŽMGK tyrėjų naudojant NEXUS programinę įrangą (serijos Nr. BDINX1103). Identifikuotų kopijų skaičiaus pokyčių (delecijų/ duplikacijų) patogeniškumo vertinimas atliktas naudojant tarptautines duomenų bazines. Pirminė duomenų analizė atlikta tarptautinėje duomenų bazėje *Database of Genomic Variants* (<http://projects.tcag.ca/variation>) norint įvertinti polimorfizmą ar sekos pokyčių dažnumą pokytį apimančioje genetinėje srityje, atmesti žinomus sekos variantus ir įvertinti genų kontekstą. Nopolimorfiniai genomo pokyčiai analizuoti DECIPHER ir ECARUCA duomenų bazėse (<http://decipher.sanger.ac.uk>, www.ecaruca.net) norint palyginti delecijos/duplikacijos dydį su aprašytais žinomais mikrodeleciniais/mikroduplikaciniais sindromais ir analizuoti pacientų su persidengiančiais chromosominiais pokyčiais klinikinius požymius. NCBI (*National center of biotechnology information*) duomenų bazėje (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) atlikta genų, kurie įtraukti į nustatytą pokytį, funkcijų analizė. Su ligomis siejamų genų analizė, priklausomai nuo tiriamojo asmens klinikinio fenotipo, atlikta naudojant



3.1 pav. Skirtingais molekulinio kariotipavimo metodais tirtų pacientų grupės. Mažos skiriamosios gebos molekulinio kariotipavimo tyrimai atlikti 10 pacientų, aukštos – 201. LGH-VNP metodu tirti 23 pacientai, vLGH – 188.

OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>) duomenų bazę.

Galimi patogeniniai kopijų skaičiaus pokyčiai buvo tvirtinami kitu nepriklausomu metodu – FISH arba realaus laiko polimerazės grandininė reakcija (RL-PGR) VU ŽMGK darbuotojų. FISH tyrimas atliktas pagal VUL SK MGC Citogenetikos laboratorijoje patvirtintą metodiką. RL-PGR diagnostinis protokolas patvirtintas VU ŽMGK Molekulinės genetikos laboratorijoje. Pacientų, tirtų 400 K vLGH genominių lustų sistemomis, kopijų skaičiaus pokyčio kilmė buvo nustatoma atsižvelgiant į tėvų vLGH tyrimo rezultatus. Likusių pacientų patvirtintų kopijų skaičiaus pokyčių kilmė buvo nustatoma VU ŽMGK darbuotojams atliekant paciento tėvų konkrečios srities DNR analizę FISH arba RL-PGR metodais.

Nustatyti patogeniniai kopijų skaičiaus pokyčiai suskirstyti į grupes:

- žinomi sindromai,
- nauji patogeniniai kopijų skaičiaus pokyčiai,
- nesubalansuotos translokacijos ir kiti sudėtingi persitvarkymai.

Išanalizuoti ir aprašyti kiekvieno paciento su patogeniniais kopijų skaičiaus pokyčiais klinikiniai požymiai. Įvertintas molekulinio kariotipavimo diagnostinis efektyvumas tiriant pacientus, turinčius INN.

3.2 ANTROJO DARBO UŽDAVINIO VYKDYMO EIGA IR METODAI

Atlikta pacientų, tirtų molekulinio kariotipavimo technologijomis, klinikinių duomenų retrospektyvinė apžvalga, kurios tikslas – nustatyti pacientams su patogeniniais kopijų skaičiaus pokyčiais būdingus kliniskus požymius. Pacientų duomenys iš Cartagena duomenų bazės perkelti į Excel rinkmeną (3.1 lent.).

3.1 lentelė. Statistinei analizei naudoti pacientų klinikiniai duomenys.

Genealogija: atvejis sporadinis ar šeiminis (INN dar bent vienam pirmos eilės giminaičiui).

Anamnezė: gestacinis amžius, gimimas (natūraliais gimdymo takais ar Cezario pjūvio operacija), ūgis, svoris, galvos apimtis gimus, Apgar įvertinimas, ūgis, svoris, galvos apimtis paskutinės genetinės konsultacijos metu, protinio atsilikimo laipsnis, hipotonija kūdikystėje, autizmas, epilepsija, kita neurologinė simptomatika.

Objektyvaus tyrimo, instrumentinių tyrimų duomenys: įgimtos anomalijos (pagal TLK-10 Q skyrių, naudojant Britų pediatrijos asociacijos (BPA) pratęsimus), mikroanomalijos (pagal EUROCAT registro rekomendacijas), fenotipiniai ypatumai (fenotipiniai požymiai, neįtraukti nei į TLK-10 Q skyrių, nei į mikroanomalijų sąrašą, tačiau pažymėti konsultavusio gydytojo genetiko vertinant fenotipą, pvz., žema kakta).

Statistinė analizė atlikta naudojant IBM SPSS Campus Professional v. 21.0 programinį paketą. Pacientų su patogeniniais kopijų skaičiaus pokyčiais klinikiniai duomenys palyginti su pacientų be patogeninių kopijų skaičiaus pokyčių naudojant χ^2 kriterijų. Esant mažam stebėjimų skaičiui arba kai nors vienas tikėtinas stebėjimų skaičius mažiau penkių, papildomai buvo skaičiuojamas tikslus Fisher kriterijus. χ^2 kriterijus parodo, ar empirinio ir teorinio skirstinių skirtumas yra reikšmingas, t. y. tikrinama, ar turimas empirinis skirstinys suderinamas su teoriniu modeliu. χ^2 kriterijaus reikšmė apskaičiuojama pagal formulę:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i},$$

čia O_i – nustatyti dažniai, E_i – tikėtini dažniai, k – bendras kintamųjų kategorijų ir grupių kaičius, lygus kryžminės lentelės eilučių ir stulpelių sandaugai.

Tyrimuose taikyta ir Mantelio-Haenszel formulė χ^2 kriterijaus reikšmei apskaičiuoti:

$$\chi^2 = r^2 \cdot (n-1),$$

čia r – Pearson koreliacijos koeficientas.

Atliktas pacientų su patogeniniais kopijų skaičiaus pokyčiais ir pacientų be chromosominių pakitimų klinikinį duomenų palyginimas atsižvelgiant į šalutinius veiksnius (lytį, epilepsiją, motorinės raidos atsilikimą, mikrocefaliją/ makrocefaliją). Požymių tarpusavio ryšiui nustatyti taikytas Spearman koreliacijos koeficientas. Jis yra tiesinės priklausomybės tarp kintamųjų kiekybinio įvertinimo kriterijus arba ryšio stiprumo matas. Koreliacijos koeficientas kinta intervale [-1; 1].

Tarkime, jog kintamųjų poros (X, Y) stebėjimai yra poros $(x_i, y_i), \dots, (x_n, y_n)$. Spearman koreliacijos koeficientą skaičiuojame, kai duomenys netenkina normalumo prielaidos arba mažai yra duomenų (< 20 stebėjimų). Iš pradžių duomenys ranguojami. Po rangavimo duomenis sudaro poros $(R_{x1}, R_{y1}), \dots, (R_{xn}, R_{yn})$.

Spearman koreliacijos koeficientas apskaičiuojamas pagal formulę:

$$r_s = \frac{\sum_{i=1}^n (R_{xi} - \frac{n+1}{2})(R_{yi} - \frac{n+1}{2})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (R_{xi} - \frac{n+1}{2})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n (R_{yi} - \frac{n+1}{2})^2}},$$

Formulėje $R_{x_i} - x_i$ rangas, o $R_{y_i} - y_i$ rangas. Spearman koreliacijos koeficientas yra Pearson koreliacijos koeficientas, apskaičiuotas ne pačioms kintamųjų reikšmėms, o jų rangams. Tarp kintamųjų priklausomybė yra stipresnė, kai koeficientas absoliučiuoju didumu yra didesnis.

Jeigu tikrinant hipotezę apie Spearman koreliacijos koeficientą p -reikšmė yra lygi p , o reikšmingumo lygmuo α , galime daryti išvadą, jog kintamieji koreliuoja, kai $p < \alpha$, o nekoreliuoja, kai $p \geq \alpha$. Spearman koreliacijos koeficiento ženklas interpretuojamas, kaip ir Pearson koeficiento ženklas, tai yra teigiamas koreliacijos koeficientas rodo tiesioginę kintamųjų priklausomybę, o neigiamas – atvirkštinę.

Norint prognozuoti patogeninį chromosominį pokytį esant tam tikriems fenotipiniams paciento požymiams, sudarytas logistinės regresijos modelis pasirenkant priklausomu kintamuoju molekulinio kariotipavimo rezultata (klasifikavimas: patologijos nenustatyta – 0, nustatytas patogeninis kopijų skaičiaus pokytis – 1) ir įtraukiant nepriklausomus kintamuosius, kurie statistiškai patikimai skyrėsi tarp grupių. Tikimybė p_i , kad atsitiktinis dydis Y_i įgis reikšmę 1, apskaičiuojama pagal formulę:

$$p_i = \frac{\exp\{z(\vec{x}_i)\}}{1 + \exp\{z(\vec{x}_i)\}}, \quad z(\vec{x}_i) = a + b_1 x_{1i} + b_2 x_{2i} + \dots + b_k x_{ki}, \quad \text{čia } x_{1i}, \dots, x_{ki} -$$

nepriklausomų kintamųjų reikšmės. Parametrų a, b_1, \dots, b_k įverčiai $\hat{a}, \hat{b}_1, \dots, \hat{b}_k$ parenkami taip, kad tikėtumo funkcija $L = \prod_{i: y_i=1} p_i \prod_{i: y_i=0} (1 - p_i)$ būtų maksimali. Jeigu $\hat{P}(Y = 1 | \vec{x}) > 0,5$, tai prognozuojame, kad Y reikšmė yra 1. Jeigu $\hat{P}(Y = 1 | \vec{x}) < 0,5$, tai prognozuojame, kad Y reikšmė yra 0.

Logistinės regresijos modelio tinkamumas vertintas pagal χ^2 , Hosmer-Lemeshow, Wald kriterijų apskaičiuotas reikšmes, determinacijos koeficientą ir klasifikacinės lentelės reikšmių atpažinimo procentą. Pasiklovimo lygmuo $\alpha = 0,05$.

3.3 KITŲ DARBO UŽDAVINIŲ VYKDYMO EIGA IR METODAI

Genotipo-fenotipo ryšio analizė atlikta naudojant literatūros duomenis (paieška PubMed tinklapyje, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) ir bendradarbiaujant su kitų šalių molekulinės citogenetikos specialistais bei gydytojais genetikais, su kuriais

susisiekti tarpininkaujant DECIPHER atstovams. DECIPHER išsiųstos užklausos dėl 6 pacientų su 7p22.1 mikroduplikacija ir 2 pacientų su 17q21.33 mikrodelecija. Gauti keturių pacientų išsamūs fenotipiniai aprašymai. Šių duomenų bei mokslinių publikacijų pagrindu atliktos genotipo-fenotipo ryšio analizės. Naujų INN genų kandidatų nustatymas atliktas analizuojant naujų patogeninių kopijų skaičiaus pokyčių srityse esančius genus. Šiuo tikslu naudotos Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>), GeneCards (<http://genecards.org/>), OMIM ir kitos duomenų bazės bei mokslinė informacija naujausiuose literatūros šaltiniuose. Analizuota informacija apie genų raiškos ypatumus, žinomus transgeninių gyvūnų modelius, sąveikos ryšius su kitais genais. Reguliacinių sekų, stambių ir sudėtingų chromosominių pokyčių klinikinės reikšmės analizė atlikta literatūros duomenų pagrindu. Taip pat analizuoti pastarųjų penkių metų literatūros duomenys apie pacientų, turinčių INN, genetinių tyrimų efektyvumą. Šio tyrimo metu gautų rezultatų ir literatūros analizės duomenų pagrindu sudarytos pacientų, turinčių INN, genetinio ištyrimo gairės.

Apibendrinimas

Iš 1223 pacientų sąrašo, vadovaujantis sudarytais pacientų atrankos kriterijais, į tyrimą įtraukta 211 šeimų. Pacientų klinikinė informacija rinkta vadovaujantis paruoštu standartizuotu klausimynu. Molekulinio kariotipavimo tyrimai atlikti vLGH 44 K, vLGH 105 K, vLGH 400 K, VNP-LGH 300 K ir VNP-LGH 700 K technologijomis, bendradarbiaujant su kitų šalių molekulinės citogenetikos laboratorijomis. Kopijų skaičiaus patogeniškumas vertintas vadovaujantis standartizuota procedūra. Galimi patogeniniai kopijų skaičiaus pokyčiai tvirtinti kitu nepriklausomu tyrimo metodu (FISH arba RL-PGR). Atliekant tėvų genetinius tyrimus, nustatyta pokyčių kilmė. Lyginant pacientų grupes su patogeniniais ir be patogeninių kopijų skaičiaus pokyčių, nustatyti klinikiniai požymiai, būdingi pacientams su chromosominiais pakitimais. Sudarytas logistinės regresijos modelis atsakymui į klausimą – kiek tikėtina gauti teigiamus vLGH tyrimo rezultatus esant tam tikriems fenotipiniams paciento požymiams. Atlikta pacientų su unikaliais kopijų skaičiaus pokyčiais genotipo-fenotipo ryšio analizės naudojant literatūros duomenis ir bendradarbiaujant su kitų šalių specialistais (tarpininkaujant DECIPHER). Analizuota stambių ir sudėtingų

chromosominių pokyčių klinikinė reikšmė. Naudojantis duomenų bazėmis ir literatūros duomenimis, analizuoti genai, esantys nustatytuose patogeniniuose kopijų skaičiaus pokyčiuose, identifikuoti kandidatiniai genai INN ir žinomo geno raiškai svarbi DNR sritis. Šio tyrimo metu gautų rezultatų ir literatūros analizės duomenų pagrindu sudarytos pacientų, turinčių INN, genetinio ištyrimo gairės. Darbo etapų schema ir autorės indėlis pateiktas III priede.

IV. TYRIMŲ REZULTATAI

Šio tyrimo tikslas – nustatyti struktūrinių chromosominių pokyčių (patogeninių kopijų skaičiaus pokyčių) klinikinę reikšmę, jų poveikį fenomui, ypač CNS raidai ir funkcijai. Rezultatai pateikti šio skyriaus dalyse, kurios atitinka iškeltus darbo uždavinius. Pirmiausia aprašytos nustatytų patogeninių kopijų skaičiaus pokyčių charakteristikos ir įvertintas molekulinio kariotipavimo tyrimo diagnostinis efektyvumas. Po to pateikta visų tirtų pacientų klinikinių duomenų analizė bei pacientų grupių su patogeniniais chromosominiais pokyčiais ir be chromosominių pakitimų klinikinių duomenų palyginimo rezultatai. Analizuojant patogeninių naujų chromosominių pokyčių grupę, apibūdinti pacientų su unikaliais patogeniniais kopijų skaičiaus pokyčiais genotipo-fenotipo ryšio ypatumai ir nustatyti nauji genai kandidatai INN ir kitiems klinikiniams požymiams. Galiausiai pateiktos pacientų, turinčių INN, genetinio ištyrimo gairės.

4.1 PATOGENINIŲ KOPIJŲ SKAIČIAUS POKYČIŲ CHARAKTERISTIKOS TIRTIEMS ASMENIMS, TURINTIEMS INTELEKTINĘ NEGALIĄ

Mokslinio darbo metu atrinkta 211 pacientų, atitinkančių pacientų atrankos kriterijus, kuriems atliktas molekulinio kariotipavimo tyrimas. Patogeniniai kopijų skaičiaus pokyčiai, siejami su pacientų klinikiniais požymiais, nustatyti 29 iš 211 tirtų pacientų (13,7 %). 14-ai iš šių pacientų tyrimai buvo atlikti vLGH 105 K, 11-ai – vLGH 400 K, trims pacientams – VNP-LGH 300 K skiriamosios gebos molekulinio kariotipavimo technologijomis. Iš viso aptikti 36 patogeniniai kopijų skaičiaus pokyčiai, daugiau nei vienas patogeninis kopijų skaičiaus pokytis nustatytas 6 pacientams.

Chromosominių pokyčių dydis įvairavo nuo 0,26 iki 18,42 Mb. Vidutinis chromosominio pokyčio dydis – 5,11 Mb, mediana – 3,12 Mb. Iš 36-ių patogeninių kopijų skaičiaus pokyčių, 24 buvo delecijos, 12 – duplikacijos. Delecijų dydis įvairavo nuo 0,28 iki 13,9 Mb, vidutinis delecijos dydis – 3,55 Mb, mediana – 2,72 Mb. Atitinkamai duplikacijų dydžiai – nuo 0,26 iki 18,42 Mb, vidurkis – 8,22 Mb, mediana – 9,4 Mb.

Pacientai su patogeniniais kopijų skaičiaus variantais suskirstyti į tris grupes: žinomų sindromų (9/29 = 31 %), naujų (neapibrėžtų kaip žinomi sindromai)

patogeninių kopijų skaičiaus pokyčių (13/29 = 45 %) ir nesubalansuotų translokacijų ir kitų sudėtingų chromosominių persitvarkymų (7/29 = 24 %). Detalūs klinikiniai ir genetiniai šių pacientų duomenys pateikti 4.1 lentelėje.

4.1 lentelė. Pacientų su patogeniniais kopijų skaičiaus pokyčiais genetiniai ir klinikiniai duomenys.

Chromosominis pokytis	Dydis Mb	Klinikinė informacija	Sindromas, literatūra
Žinomi sindromai			
arr 2q37.3 (239,525,614- 242,717,216)x1 dn	3,19	Amžius 3 m., ♀. Psichomotorinės raidos atsilikimas, epilepsija, stereotipiniai judesiai, hipotelorizmas, siaura viršutinė lūpa, smailas smakras, hipertrichožė nugaros srityje, ilgi pėdų pirštai.	2q37 monosomijos sindromas
arr 5q35.3 (176,728,738- 176,992,730)x3 dn	0,26	Amžius 4 m., ♀. Raumenų hipotonija, vidinė hidrocefalija, aukštas ūgis, makrocefalija, pailgas veidas, reti plaukai temporalinėse srityse, smailas smakras, hipertelorizmas, mikrostomija, kreivakaklystė.	Sotos s. Kasnauskienė ir kiti (61)
arr 11q23.3q25 (120,505,418- 134,452,384)x1 mat Karyotype of the mother: 46,XX,t(11;13) (q23.3;q10)	13,9	Amžius 11 mėn., ♂. Raidos atsilikimas, atopinis dermatitas, anemija, trombocitopenija, makrocefalija, trumpas kaklas, hipertelorizmas, žvairumas, epikantas, įstriži žemyn vokų plyšiai, žemai prisitvirtinusios, deformuotos ausys, retrognatija, brachidaktilija, trumpa plati pėda, II ir III kojos pirštų odinė sindaktilija, kapšelio displazija. Galvos smegenų KT – vėluojanti mielinizacija. Selektyvus kurtumas aukštiesiems garsams.	Jacobsen s.
arr15q11.2q13.1 (22,293,861- 26,890,764)x1 dn	4,6	Amžius 11 mėn., ♂. Psichomotorinės raidos vėlavimas, stereotipiniai judesiai, mikrocefalija, atlėpę ausų kaušeliai, žemai prisitvirtinusios ausys, skersinės delnų raukšlės, hipoplastiškas kapšelis.	Angelman s.
arr 16p11.2 (29,563,985- 30,106,254)x1 dn	0,89	Amžius 6 m., ♂. Psichomotorinės raidos atsilikimas, hipotonija, toliaregystė, dolichocefalija, žemai prisitvirtinusios ausys, įstriži žemyn vokų plyšiai, stora apatinė lūpa, iškili krūtinės ląsta, pirštų klinodaktilija.	16p11.2 mikrodelecijos/ mikroduplicaci- jos sindromas. Čiuladaitė ir kiti (62)

Chromosominis pokytis	Dydis Mb	Klinikinė informacija	Sindromas, literatūra
arr 16p11.2 (29,215,334-30,106,254)x1 mat	0,54	Amžius 7 m., ♀. Lengvas protinis atsilikimas, asteninis kūno sudėjimas, įdubusi krūtinės ląsta, sąnarių hipermobilumas.	16p11.2 mikrodelecijos/mikroduplicacijos sindromas. Ciuladaite ir kiti (62)
arr 16p13.3 (2,589,524-3,911,387)x3 dn	1,32	Amžius 16 m., ♀. Lengvas protinis atsilikimas, vėluojantis lytinis brendimas, hipersteninis kūno sudėjimas, brachicefalija, grubūs veido bruožai, žema kakta, žemai prisitvirtinusios ausys, nežymūs kaklo sparneliai, plati krūtinės ląsta.	16p13.3 mikroduplicacinis s.
arr 22q13.31 q13.33 (45,834,903-49,529,400)x1 dn	3,86	Amžius 2 m., ♂. Psichomotorinės raidos atsilikimas, autistinis elgesys, raumenų hipotonija, išorinė ir vidinė hidrocefalija, smegenėlių hipoplazija, iškili kakta, nusmailėjantys ausų kaušeliai, dešinės kojos II-III pirštų odinė dalinė sindaktilija, didelės pėdos.	Phelan McDermid s.
arr 22q11.21 (17,018,751-19,795,282)x1 dn	2,78	Amžius 20 m., ♂. Lengvas protinis atsilikimas, miego sutrikimai, nežymiai įstriži, siauri akių plyšiai, displastiški ausų kaušeliai, ribota dilbių supinacija, nežymi kifozė, hipospadija, skilvelių pertvaros defektas, bronchų astma, lėtinis tireoiditas.	DiGeorge s.
Nauji patogeniniai kopijų skaičiaus pokyčiai			
arr 1p36.11 (26,714,062-27,728,654)x1 dn	1,02	Amžius 7 m., ♀. Intelektinė negalia, klausos sutrikimas, didžiosios smegenų jungties agenezė, vidinė hidrocefalija, hipotrofija, įgimtas stridoras, dviragė gimda, anomali šlapimtakių lokalizacija, kaukolės deformacija, žemai prisitvirtinusios ausys, preaurikulinė fistulė, storos lūpos, įdubęs krūtinkaulis, baminė išvarža, pėdos deformacijos, platūs kojų pirštų distaliniai pirštakauliai.	
arr 2p16.1p14 (58,656,378-68,790,747)x3 dn	10,13	Amžius 9 m., ♂. Lengvas protinis atsilikimas, elgesio sutrikimai (hiperaktyvumas, hiperfagija, vėmimo priepuoliai), epilepsija, makrocefalija, atviros šnervės, juodoji akantozė periorbitalinėse, pirštų sąnarių, alkūnių, kelių ir kaklo srityse, hepatomegalija.	Kasnauskienė ir kiti (63)

Chromosominis pokytis	Dydis Mb	Klinikinė informacija	Sindromas, literatūra
arr 2p22.1p16.1 (40,059,584-57,546,352)x3 dn	17,49	Amžius 13 m., ♀. Vidutinis protinis atsilikimas, elgesio ir emocijų sutrikimas, prieširdžių pertvaros defektas, makrocefalija, aukšta ir iškili kakta, platūs, lenkti antakiai, hipertelorizmas, preaurikulinė išauga, displastiški kojų nykščių nagai, lumbalinė hiperlordozė, kelių fleksinės deformacijos, plokščiapėdystė.	Kasnauskienė ir kiti (63)
arr 2q34 (212,505,294-213,463,152)x1 dn	0,96	Amžius 15 m., ♂. Vidutinis protinis atsilikimas, aukštas ūgis, platūs antakiai, atlėpusios ausys, storos lūpos, V-ų pirštų klinodaktilija.	Walsh et al. (42), Backx ir kiti (64), Kasnauskienė ir kiti
arr 2q24.2q24.3 (162,118,995-164,461,141)x1dn	2,34	Amžius 3 m., ♂. Psichomotorinės raidos atsilikimas, hipotonija kūdikystėje, stereotipiniai judesiai, žvairumas, kreivakaklystė, sakralinė duobutė.	Magri ir kiti (65), Krepischi ir kiti (66)
arr 4q28.3 (137,417,138-138,947,393)x1mat	1,53	Amžius 3 m., ♂. Sunkus psichomotorinės raidos atsilikimas, traukuliai, mikrocefalija, didžiosios smegenų jungties hipoplazija, vidinė hidrocefalija, apvalus veidas, didelės ausys, pirštų sąnarių hiperomobilumas, smailėjantys plaštakų pirštai, platūs pėdų nykščiai, sakralinė duobutė.	Kasnauskienė ir kiti (67)
arr 4q21.22 (83,373,844-84,097,897)x1 dn	0,72	Amžius 18 m., ♀. Sunkus protinis atsilikimas, epilepsija, hipotonija kūdikystėje, nutukimas, prognatija, nedidelės plaštakos ir pėdos, skersinė raukšlė delne, brachidaktilija.	Bonnet ir kiti (68)
arr 7p22.1 (5,337,072-6,316,915)x3 dn	0,98	Amžius 14 m., ♀. Hipersteninis kūno sudėjimas, makrocefalija, vidinė hidrocefalija, paprastos sandaros ausys, įstriži žemyn vokų plyšiai, nusmailėjantys pirštai, plokščiapėdystė.	Chui ir kiti (69), Preikšaitienė ir kiti (70)
arr 7q35q36.1 (146,392,196-149,441,454)x1dn	3,05	Amžius 11 m., ♂. Vidutinis protinis atsilikimas, epilepsija, makrocefalija, žemai prisitvirtinusios atlėpę ausys, siauri akių plyšiai, stora apatinė lūpa, iškili krūtinės ląsta, ribota alkūnių ir kelių judesių amplitudė.	Poot ir kiti (71)
arr 14q32.12q32.3 (90,907,243-105,866,436)x3	14,96	Amžius 21 m., ♂. Lengvo laipsnio protinis atsilikimas, šizoafektinis sutrikimas, depresinis tipas, nutukimas, skersinė delno raukšlė, platus tarpas tarp I-II pėdų pirštų, sąnarių hiperomobilumas, osteochondrozė, lordozė, dauginės stuburo diskų išvaržos.	

Chromosominis pokytis	Dydis Mb	Klinikinė informacija	Sindromas, literatūra
arr 15q22.2 q24.1 (62,383,648-71,456,752)x3 dn	9,06	Amžius 23 m., ♀. Intelektinė negalia, įgimta širdies yda, žvairumas, klubų displazija, nutukimas, ilgas liemuo, grubūs veido bruožai, žema kakta, putlūs skruostai, retrognatija, aukštas gomurys, vienas centrinis kandis, netaisyklingas sąkandis, brachidaktilija, plokščiapėdystė, šleivapėdystė.	
arr 16q22.3 (70,919,282-71,645,680)x1 dn	0,73	Amžius 18 m., ♀. Intelektinė negalia, gimdos hipoplazija, pailgas veidas, aukšta kakta, reti plaukai temporalinėse srityse, storos lūpos, hipoplastiški ausų speneliai.	
arr 17q21.33 (93497294 - 105866436)x1 dn	1,8	Amžius 17 m., ♂. Lengvas protinis atsilikimas, žemas ūgis, mikrocefalija, ilgas veidas, didelė nosis, iškila nosies nugarėlė, mažas apatinis žandikaulis, plaštakų V-ų pirštų klinodaktilija, platus tarpas tarp I-II pėdų pirštų, miopija.	Preiškaitienė ir kiti (72)
Nesubalansuotos translokacijos ir kiti sudėtingi persitvarkymai			
arr 8 p23.3p23.1 (0-7,036,726)x1, 15q26.1q26.3 (90,472,251-100,338,915)x3dn	7,0 9,9	Amžius 2 metai, ♀. Psichomotorinės raidos atsilikimas, hipotonija kūdikystėje, ventrikulomegalija, hipermetropija, konverguojantis žvairumas, aukšta kakta, įdubusios smilkinių sritys, įstriži žemyn vokų plyšiai, ptozė, vokų plyšių asimetrija, periorbitalinės srities pilnumas, žemai prisitvirtinusios ausys, smailėjantys plaštakų pirštai, hipertrichozė nugaros srityje.	
arr 21q22.3 (41,817,957-46,944,323)x1, 21q22.2q22.3 (39,774,417-41,817,957)x3 dn	5,03 2,04	Amžius 14 m., ♂. Vidutinė intelektinė negalia, vidutinis kalbos neišsivystymas, motorinė alalija, asteninis kūno sudėjimas, netaisyklinga laikysena, trys verpetai galvos plaukuotoje dalyje, dermatoglifikos pokyčiai, pėdų pirštų arachnodaktilija.	
arr 4p16.3 (0-4,194,871)x1, 11p15.5p15.4 (0- 3,357,154)x3 pat	4,19 3,36	Amžius 19 m., ♀. Intelektinė negalia, hiperaktyvumas, simptominė epilepsija, įgimta klubų displazija, įgimta širdies yda (PPD, plaučių arterijos vožtuvo stenozė), žemas ūgis, mikrocefalija, iškili nosies nugarėlė, hipertelorizmas, akies abiejų vokų kolobomos, trumpas filtras, mikrogenija, stuburo deformacija, V-ų pirštų klinodaktilija, trumpas V plaštakos pirštas, tarpas tarp pėdų I ir II pirštų, dermatoglifikos pokyčiai delnuose.	4p delecija lemia Wolf-Hirschhorn s.

Chromosominis pokytis	Dydis Mb	Klinikinė informacija	Sindromas, literatūra
arr 5p15.33p15.31 (0-8,157,370)x1, 12q24.21q24.33 (113,931,344- 132,349,534)x3 mat	8,16 18,42	Amžius 3 m., ♂. Psichomotorinės raidos atsilikimas, židininė epilepsija, didžiosios smegenų jungties hipoplazija, seklios smegenų vagos. Aukšta kakta, išreikšti antakių lankai, akių hipertelorizmas, trumpas filtras, mažas apatinis žandikaulis, atitrauktas nykštys, sakralinė duobutė.	
arr 5p14.3 p14.1 (23,025,478- 26,938,536)x1 dn 46,XY,t(3;14)(6;20) (q12;q11.2) (q21;p11.2), <i>de novo</i>	3,91	Amžius 4 m., ♂. Sunkus psichomotorinės raidos atsilikimas, traukuliai, mikrocefalija, didelės ausys, nuožulni kakta, optinių diskų atrofija.	5p delecija lemia Cri du chat s.
arr 5q14.3 (86,456,211- 89,104,733)x1, 6q21 (104,995,949- 105,493,496)x1, 16q23.1 (81,507,514- 81,784,949)x1 dn 46,XY,t(6;16) (q25;q12.1), <i>de novo</i>	2,65 0,5 0,28	Amžius 7 mėn., ♂. Sunkus psichomotorinės raidos atsilikimas, padidėjęs raumenų tonusas, atvira ovalioji anga, brachicefalija, hipertelorizmas, žvairumas, žema nosies nugarėlė, ilgas filtras, maža burna, žemai prisitvirtinusios ausys, mikropenis.	
arr 4q34.3q35.2 (179,503,254- 191,162,351)x1, 8p23.3p23.1 (0-10,772,254)x3	11,66 10,77	Amžius 12 m., ♂. Vidutinis protinis atsilikimas, agresyvus elgesys, klausos sutrikimas, makrocefalija, aukšta kakta, hipertelorizmas, žvairumas, vagelė ausų spenelyje, epikantas, įdubusi nosies nugarėlė, politelija, arachnodaktilija.	

Rezultatų aptarimas

Mokslinio darbo metu nustatytas molekulinio kariotipavimo efektyvumas, tiriant asmenis, turinčius INN, yra 13,7 %. Šis rezultatas yra artimas kitų mokslinių tyrimų duomenims, kuriuose patogeniniai chromosominiai pokyčiai molekulinio kariotipavimo tyrimu nustatomi vidutiniškai 5-15 % asmenų, turinčių INN (27, 28). Tikėtina, kad molekulinio kariotipavimo diagnostinis efektyvumas priklauso nuo pacientų atrankos kriterijų. Tačiau skirtingų tyrėjų rezultatai gana prieštaringi. Vries ir

kitų duomenimis (73), submikroskopiniai subtelomeriniai chromosominiai pokyčiai dažniau nustatomi pacientams su sunkia INN ir dismorfjiniais požymiais. Pastarieji rekomenduoti kaip indikatoriai (subtelomerinio FISH) tyrimui, norint padidinti subtelomerinių chromosominių pokyčių aptikimo efektyvumą. Hochstenbach ir kitų (74) apžvalgoje (2011 m.) pateikiami molekulinio kariotipavimo rezultatai 50 studijų, kuriose mikrodelecijoms ir mikroduplikacijoms nustatyti pacientams, turintiems INN ir normalų kariotipo tyrimo rezultatą, buvo taikomi vLGH arba VNP-LGH metodai. Šių studijų duomenimis, vidutinis diagnostinis molekulinio kariotipavimo efektyvumas – 13,6 %, tačiau intervalas labai platus (nuo 3,7 % iki 50 %). Molekulinio kariotipavimo diagnostinis efektyvumas, pacientus tyrimui parenkant atsitiktinai, buvo mažesnis nei studijų, kuriose tiriamųjų grupės buvo sudarytos pagal atrankos kriterijus. Tačiau, priešingai nei tikėtasi, studijose, į kurias įtraukti pacientai su sunkesniais klinikiniais požymiais, tyrimo diagnostinis efektyvumas buvo mažesnis (11 %) nei tose, kuriose tokios sistemos nepaisyta (14,4 %).

Molekulinio kariotipavimo diagnostinis efektyvumas taip pat priklauso nuo pacientų bazinio ištyrimo. Didžiąsai daliai pacientų, įtrauktų į šį tyrimą, anksčiau buvo atlikti plataus masto diagnostiniai tyrimai. Į šį mokslinį projektą įtraukti tik tie asmenys, kurių kariotipo tyrimas buvo normalus. Dalis pacientų buvo tikrinti dėl subtelomerinių chromosominių pokyčių subtelomeriniu FISH tyrimu. Berniukams buvo atliktas *FMRI* geno tyrimas dėl lūžiosios X chromosomos sindromo ekskliudavimo. Taip pat daugeliui pacientų buvo atlikti tyrimai dėl paveldimųjų medžiagų apykaitos ligų: kiekybinis aminorūgščių kraujo plazmoje tyrimas, organinių rūgščių šlapime tyrimas ir kt.

Šiame tyrime dažnesnis delecijų nei duplikacijų nustatymas pacientams, turintiems INN, patvirtina didesnę delecijų patogeniškumo potencialą. Persitvarkymo pobūdis (delecija ar duplikacija) yra svarbus kriterijus vertinant kopijų skaičiaus pokyčio reikšmę fenotipui (38). Duplikacijos paprastai pasižymi lengvesniu klinikinio efektu dėl to, kad organizmas dažnai lengviau toleruoja genų dozės perteklių nei stoką. Tai rodo ir šio tyrimo metu nustatyti patogeninių delecijų bei duplikacijų dydžio skirtumai – vidutinis delecijų dydis 2,3 karto mažesnis nei duplikacijų.

Žinomų sindromų nustatymo dažnį molekulinio kariotipavimo tyrimu vertinti sunku, kadangi šiam tyrimui buvo atrinkti pacientai su nežinomos priežasties INN, t. y. prieš įtraukiant į tyrimą, pacientams buvo atliktas kariotipo tyrimas ir kiti genetiniai tyrimai, padedantys atmesti konkrečios genetinės būklės įtarimą. Tačiau svarbus šio darbo rezultatas, rodantis molekulinio kariotipavimo taikymo būtinybę asmenims, turintiems INN, yra didelis kliniškai neatpažįstamų (neaprašytų kaip mikrodeleciniai ar mikroduplicaciniai sindromai, žr. 2.1 lent.) chromosominių pokyčių nustatymo dažnis. Atmetus žinomus sindromus, patogeniniai kopijų skaičiaus pokyčiai buvo nustatyti 20 iš 29 pacientų (69 %). Taigi molekulinis kariotipavimas suteikia galimybę nustatyti diagnozę didžiajai daliai pacientų, turinčių INN, kurios įtarti „pirma fenotipas“ principu neįmanoma. Detali fenotipinių požymių analizė pacientams su patogeniniais chromosominiais pokyčiais ir be jų pateikta tolesniame skyriuje.

4.2 GENOMINIŲ POKYČIŲ FENOMINĖS CHARAKTERISTIKOS

Norint įvertinti patogeninių kopijų skaičiaus pokyčių reikšmę asmenų, turinčių INN, klinikiniam požymiams, retrospektyviai analizuoti į šį mokslinį darbą įtrauktų pacientų su INN klausimynų duomenys. Pirmiausia apžvelgti visų tyrime dalyvavusių pacientų, turinčių INN, klinikinių duomenų ypatumai, po to palygintos pacientų su chromosominiais persitvarkymais ir be jų grupės, siekiant nustatyti klininius požymius, charakteringus pacientams su patogeniniais kopijų skaičiaus pokyčiais. Pateiktas efektyvus logistinės regresijos modelis su trimis nepriklausomais rizikos veiksniais, patikimai prognozuojančiais patogeninio chromosominio pokyčio nustatymą.

4.2.1 Tyrime dalyvavusių asmenų, turinčių intelektualinę negalią, klinikinių požymių analizės rezultatai

Asmenų, turinčių INN, kuriems atliktas molekulinio kariotipavimo tyrimas, klinikinė informacija rinkta pagal standartizuotus klausimynus, duomenys kaupti CARTAGENIA duomenų bazėje. Gavus molekulinio kariotipavimo tyrimų rezultatus, retrospektyviai atlikta klinikinių duomenų statistinė analizė.

Iš visų tirtų pacientų, 148 (70,1 %) buvo berniukai, 63 (29,9 %) – mergaitės. Vertinti 209-ių tiriamųjų genealogijos duomenys, 11,5 % šių atvejų buvo šeiminiai (yra dar bent vienas I eilės giminaitis, turintis INN, šeimoje), 88,5 – sporadiniai. Klausimynuose buvo nurodytas 204 pacientų gestacinis laikas, kuris buvo suskirstytas į keturias kategorijas: < 33 sav., nuo 33 iki 37 sav. + 6 d., nuo 38 iki 39 sav. + 6 d., ir ≥ 40 gest. sav. Daugiausia pacientų gimė išnešioti (38 - 39 sav. + 6 d.) – 74,5 %, 33 – 37 sav. + 6 d. gestacijos laiku gimė 12,7 %, iki 33 sav. – 3,4 %, pernešioti (≥ 40 gest. sav.) – 9,3 % tiriamųjų. 71,7 % iš 173 pacientų, kurių gimimo būdas buvo nurodytas klausimyne, gimė natūraliais gimdymo takais, likę – Cezario pjūvio operacijos metu. Analizuoti 119-os tirtų pacientų Apgar įvertinimai (1-ą ir 5-ą min. po gimimo). Išskirtos dvi kategorijos: abu įvertinimai ne mažiau 9 balų, bent vienas įvertinimas <9 balų. Iš 123 pacientų bent vienas mažesnis negu 9 balų įvertinimas buvo 42,3 % asmenų.

Ūgio, svorio, svorio/ ūgio priklausomybės ir galvos apimties matavimai buvo vertinti procentilėmis (%) ir suskirstyti į kategorijas: <3 ‰, 3-25 ‰, 26-74 ‰, 75-97 ‰, >97 ‰. Taikytas ir kitas kategorijų sudarymo variantas: <3 ‰, 3-97 ‰ ir >97 ‰. Analizuoti pacientų matavimai jiems gimus ir paskutinės apžiūros metu. Klausimynuose buvo nurodytas 174 pacientų ūgis gimus, iš jų 2,9 ‰ ūgis buvo <3 ‰, 37,4 ‰ – 3-25 ‰, 32,2 ‰ – 26-74 ‰, 23,6 ‰ – 75-97 ‰ ir 4 ‰ pacientų gimimo ūgis buvo didesnis nei 97 ‰. Taigi šis parametras 93,1 ‰ iš 174 tiriamųjų buvo neviršijant 3-97 ‰. Svoris gimus buvo nurodytas 194 pacientų klausimynuose. Iš jų 12,4 ‰ gimė <3 ‰ svorio, 40,2 ‰ – 3-25 ‰, 29,9 ‰ – 26-74 ‰, 14,9 ‰ – 75-97 ‰ ir 2,6 ‰ pacientų svoris gimus buvo >97 ‰. Į 3-97 ‰ svorio ribas pateko 85,1 ‰ pacientų. Galvos apimties matavimai gimus nurodyti 41 tiriamojo klausimynuose, iš jų 12,2 ‰ galvos apimtis gimus buvo <3 ‰, 43,9 ‰ – 3-25 ‰, 24,4 ‰ – 26-74 ‰, 14,6 ‰ – 75-97 ‰ intervale, 4,9 ‰ pacientų – didesnė nei 97 ‰. 82,9 ‰ pacientų galvos apimtis gimus buvo 3-97 ‰ intervale. Klausimynuose nurodytas 194 pacientų ūgis, pamatuotas paskutinės gydytojo genetiko konsultacijos metu. Iš jų 6,2 ‰ pacientų ūgis <3 ‰, 33 ‰ – 3-25 ‰, 34,5 ‰ – 26-74 ‰, 22,2 ‰ – 75-97 ‰ intervaluose, 4,1 ‰ – didesnis nei 97 ‰. Iš viso 89,7 ‰ pacientų ūgis neviršijo 3-97 ‰. 199-ių tirtų pacientų pasiskirstymas pagal svorį paskutinės konsultacijos metu: 12,6 ‰ – mažiau negu 3 ‰, 31,7 ‰ – 3-25 ‰, 21,1 ‰ – 26-74 ‰, 29,1 ‰ – 75-97 ‰ intervaluose, 5,5 ‰ – daugiau negu 97 ‰. 81,9 ‰ pacientų svoris buvo 3-97 ‰ intervale. Svorio/ ūgio priklausomybė įvertinta 191 pacientui. <3 ‰ svorio/ ūgio priklausomybė stebėta 7,9 ‰, 3-25 ‰ intervale – 36,1 ‰, 26-74 ‰ – 25,1 ‰, 75-97 ‰ – 22 ‰, didesnė nei 97 ‰ svorio/ ūgio priklausomybė nustatyta 8,9 ‰ tiriamųjų. 83,2 ‰ analizuotų pacientų svorio/ ūgio priklausomybės reikšmės buvo 3-97 ‰ intervale. Analizuoti 192 pacientų, turinčių INN, galvos apimčių paskutinės konsultacijos metu duomenys. Iš jų 14,1 ‰ galvos apimtis buvo <3 ‰, 26 ‰ – 3-25 ‰, 25 ‰ – 26-74 ‰, 22,9 ‰ – 75-97 ‰ intervale, 12 ‰ pacientų galvos apimtis buvo didesnė nei 97 ‰. Iš viso 74 ‰ pacientų galvos apimčių duomenys pateko į 3-97 ‰ intervalą.

Vyresnių nei 5 m. tiriamųjų INN laipsnis buvo suskirstytas į kategorijas pagal intelekto koeficiento įvertį: lengva INN (IQ 50-70), vidutinė (IQ 35-50), sunki (IQ <35), taip pat išskirta ketvirta kategorija, kuriai priskirti asmenys, turintys

nepatikslintą INN laipsnį. Tyrime dalyvavo 98 vyresni nei 5 metai asmenys, iš jų 39,8 % – su lengva INN, 29,6 % – vidutinio sunkumo, 19,4 % – sunkia, 11,2 % tiriamųjų INN laipsnis nepatikslintas. Mažesniems nei 5 metai asmenims (viso 113) buvo stebimas raidos atsilikimas, 9,7 % iš jų raidos atsilikimas buvo sunkaus laipsnio.

Įvertinus anketinius duomenis apie tiriamųjų motorinę raidą, nustatyta, kad 32,2 % tiriamųjų motorinė raida atitiko amžiaus normas, 63,5 % pacientų stebėtas motorinės raidos atsilikimas, 4,3 % tiriamųjų duomenys apie raidą nenurodyti. Hipotonija kūdikystėje stebėta 32,2 % tirtų pacientų. 13,7 % tiriamųjų buvo diagnozuotas autizmas. Epilepsijos diagnozė pažymėta 27 %, kita neurologinė simptomatika – 1,4 % pacientų, turinčių INN. Sindrominiams priskirti tie INN atvejai, kai be INN stebėti kiti fiziniai, elgesio ar neurologiniai požymiai. Didžiajai daliai tiriamųjų, 181 pacientams (85,8 %), INN buvo sindrominė.

Registruota 1230 fenotipinių požymių, pažymėtų pacientų objektyvaus ištyrimo ir medicininės dokumentacijos duomenimis (4.2 lent.). Iš jų – 192 (15,6 %) įgimtos anomalijos, 606 (49,27 %) mikroanomalijos (pagal EUROCAT registro rekomendacijas) ir 432 (35,12 %) kiti fenotipiniai ypatumai. Bent viena įgimta anomalija stebėta 103 (48,82 %) pacientams, 24 (11,4 %) pacientams nustatytos trys ir daugiau įgimtų anomalijų. Bent viena mikroanomalija buvo 182 (86,3 %) pacientams, trys ir daugiau mikroanomalijų – 103 (48,8 %) tirtų asmenų, turinčių INN.

Įgimtos nervų sistemos formavimosi ydos nustatytos 65 tirtiems pacientams, turintiems INN. Iš viso registruotos 83 CNS anomalijos, iš jų 82 – įgimtos anomalijos ir 1 mikroanomalija. Dažniausia CNS įgimta anomalija, nustatyta 31 (14,7 %) pacientui – mikrocefalija, kiek rečiau diagnozuota įgimta hidrocefalija (23 pacientams, 10,9 % visų pacientų), didžiosios smegenų jungties formavimosi yda (8 pacientams, 3,8 %), įgimta optinė atrofija (7 pacientams, 3,3 %) ir kitos.

Įgimtos akies, ausies, veido ir kaklo formavimosi ydos bei šių sričių mikroanomalijos pagal EUROCAT rekomendacijas registruotos 123 (58,3 %) pacientams. Įgimtos anomalijos buvo 10 (4,7 %) pacientų, mikroanomalijos – 123 (58,3 %) pacientams. Daugiau nei 3 akies, ausies, veido ir kaklo mikroanomalijos stebėtos 18 (8,5 %) pacientų. Iš viso nustatyta 13 įgimtų anomalijų ir 223 mikroanomalijos. Dažniausia iš įgimtų anomalijų – įgimta ptozė, stebėta 5 (2,4 %)

pacientams. Iš mikroanomalijų sąrašo dažniausios – ausų mikroanomalijos (103), registruotos 82 (38,9 %) pacientams. Antros pagal dažnumą šioje grupėje – akių mikroanomalijos (iš viso 60), pažymėtos 56 (26,5 %) pacientų fenotipo aprašyme. Dažniausios iš jų – epikantas (25 pacientams, 11,8 %), trumpi vokų plyšiai (10 pacientų, 4,7 %), melsvos skleros (8 pacientams, 3,8 %), įstriži žemyn vokų plyšiai (7 pacientams, 3,3 %) ir įstriži aukštyn vokų plyšiai (7 pacientams, 3,3 %). Tiriamiesiems retesnės burnos mikroanomalijos (iš viso 29), stebėtos 27 (12,8 %) pacientams. Dažniausia – stora apatinė lūpa (16 pacientų, 7,6 %), retesnės – makrostomija (8 pacientams, 3,8 %) ir mikrostomija (5 pacientams, 2,4 %).

26-iems (12,3 %) tirtiems asmenims, turintiems INN, registruotos 37 įgimtos kraujo apytakos sistemos formavimosi ydos, iš jų 2 mikroanomalijos. Dažniausia įgimta anomalija, prieširdžių pertvaros defektas, buvo 13 (6,2 %) pacientų, skilvelių pertvaros defektas diagnozuotas 5 pacientams (2,4 %), toks pat dažnis buvo įgimto dviburio vožtuvo nesandarumo.

Įgimtos kvėpavimo sistemos formavimosi ydos buvo trims (1,4 %) pacientams: dviem – nesuaugęs liežuvėlis, vienam – choanų atrezija. Kiek dažnesnės virškinimo sistemos formavimosi ydos (32), nustatytos 31 pacientui. Iš jų įgimtos anomalijos – 4 asmenims, likusiems – mikroanomalijos (dažniausia – aukštas skliautinis gomurys, 27 pacientams).

21-am pacientui nustatytos įgimtos lyties organų formavimosi ydos (iš viso 25). Šių anomalijų grupėje buvo 10 įgimtų anomalijų ir 15 mikroanomalijų. Dažniausia įgimta anomalija – įgimta (kita) varpos formavimosi yda (4 pacientams, 1,9 %), hipospadija buvo 3 pacientams (1,4 %), sėklidės ir kapšelio hipoplazija – 2 (0,9 %), gimdos ir kaklelio formavimosi yda – 1 (0,5 %). Dažniausia mikroanomalija šioje grupėje – kriptorchizmas (11 pacientų, 5,2 %). Registruota tik viena įgimta šlapimo organų formavimosi yda – papildomas inkstas, diagnozuotas dviem pacientams.

133 (63 %) pacientams nustatytos įgimtos raumenų ir skeleto sistemos formavimosi ydos bei šios sistemos mikroanomalijos iš EUROCAT sąrašo. Iš viso – 268 anomalijos: 42 įgimtos anomalijos (15,7 %) ir 226 mikroanomalijos (84,3 %). Bent viena šios grupės įgimta anomalija buvo 32 (15,2 %) pacientams, bent viena

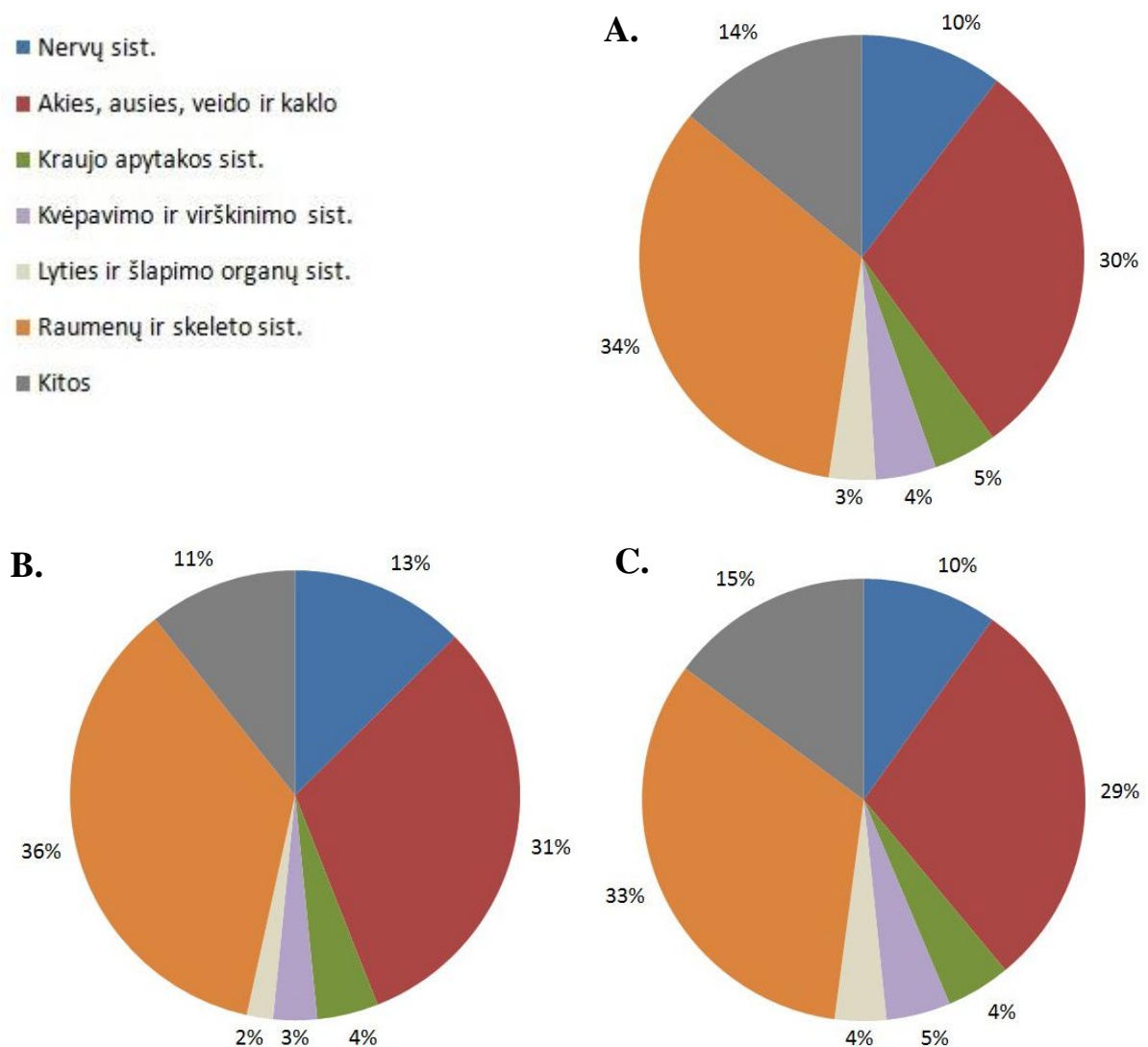
mikroanomalija – 124 (58,8 %) tirtiems asmenims. Dažniausia įgimta anomalija – brachidaktilija (10 pacientų, 4,7 %), retesnės – brachicefalija (7 pacientams, 3,3 %), kitos stuburo formavimosi ydos, nesusijusios su skolioze (5 pacientams, 2,4 %), įgimta gūžduobės displazija (4 pacientams, 1,9 %) ir kitos. Klinodaktilija buvo dažniausia šios sistemos mikroanomalija (42 pacientams, 19,9 %), hipertelorizmas stebėtas 34 (16,1 %), makrocefalija – 25 (11,8 %) pacientams. Pėdos mikroanomalijos buvo taip pat 25-iems pacientams (11,8 %), dažniausia - plokščiapėdystė (20 pacientų). Įgimta skoliozė nustatyta 21 (10 %) tirtam asmeniui, kiek rečiau – įduba krūtinės ląsta (18, 8,5 %) bei kitos mikroanomalijos.

Kitos įgimtos formavimosi ydos (iš viso 112) buvo stebėtos 80 (37,9 %) pacientų. Dažniausios – balintos kavos dėmė (24 pacientams, 11,4 %), anomalios delno raukšlės (15 pacientų, 7,1 %), hipertrichozė ir sakralinė duobutė (po 12 pacientų, 5,7 %).

Daugiausia stebėta raumenų ir skeleto sistemos anomalijų (4.1 pav.). Jos sudarė 34 % visų registruotų įgimtų anomalijų ir mikroanomalijų. Kiek mažiau nustatyta akies, ausies, veido ir kaklo įgimtų formavimosi ydų (30 %). Trečios pagal dažnumą – kitos įgimtos formavimosi ydos (14 %), ketvirtos – nervų sistemos įgimtos anomalijos (10 %), dar rečiau stebėtos kraujo apytakos, kvėpavimo, virškinimo, lyties ir šlapimo sistemų įgimtos anomalijos ir mikroanomalijos. Dažniausia įgimta anomalija – mikrocefalija (31 iš 129 įgimtų anomalijų, 24 %), kitos registruotos gerokai rečiau – įgimta hidrocefalija – 23 tiriamiesiems (17,8 % visų anomalijų), prieširdžių pertvaros defektas – 13 pacientų (10 % visų anomalijų). Dažniausiai stebėtos mikroanomalijos – nepatikslingi ausų dismorfiniai požymiai (46 iš 606 mikroanomalijų, 7,6 %), klinodaktilija (44 atvejai, 7,3 %) ir hipertelorizmas (34 atvejai, 5,6 %).

Analizuoti anomalijų tarpusavio ryšiai taikant Spirmeno koreliacijos koeficientą. Nustatyta bent vienos įgimtos anomalijos ir bent vienos mikroanomalijos tarpusavio silpna, bet statistiškai reikšminga koreliacija ($r=0,197$, $p=0,004$). Pastebėtas bent vienos įgimtos anomalijos ir trijų ar daugiau mikroanomalijų silpnas koreliacinis ryšys ($r=0,241$, $p=0,0001$) bei bent vienos įgimtos anomalijos ir trijų ar daugiau fenotipinių požymių silpna teigiama koreliacija ($r=0,206$, $p=0,003$). Tiek vienos mikroanomalijos, tiek trijų ar daugiau mikroanomalijų buvimas statistiškai

reikšmingai koreliuoja su fenotipinių ypatumų pasireiškimu (atitinkamai $r=3,9$, $p=0,0001$ ir $r=0,321$, $p=0,0001$). Nustatyta silpna teigiama įgimtų nervų sistemos formavimosi ydų ir trijų ar daugiau mikroanomalijų koreliacija ($r=0,17$, $p=0,013$). Įgimtų nervų sistemos formavimosi ydų pasireiškimas taip pat silpnai koreliuoja su įgimtomis akies, ausies, veido ir kaklo mikroanomalijomis ($r=0,19$, $p=0,006$). Nustatyta silpna teigiama koreliacija analizuojant bent vienos įgimtos akies, ausies, veido ir kaklo mikroanomalijos, taip pat bent vienos įgimtos raumenų ir skeleto sistemos formavimosi ydos pasireiškimą ($r=0,228$, $p=0,001$).



4.1 pav. Įgimtų anomalijų ir mikroanomalijų procentinis pasiskirstymas pagal organų sistemas: visiems tirtiems pacientams, turintiems INN (A), asmenims su patogeniniais kopijų skaičiaus pokyčiais (B) ir pacientams, kuriems patogeninių chromosominių pokyčių nenustatyta (C).

4.2 lentelė. Įgimtų anomalijų ir mikroanomalijų skaičius pacientams su patogeniniais kopijų skaičiaus pokyčiais (KSP) ir be jų. *Mikroanomalijos iš EUROCAT mikroanomalijų sąrašo.

TLK kodas/*, įgimta anomalija	Anomalijų skaičius		
	KSP	Be KSP	Viso
ĮGIMTOS NERVŲ SISTEMOS FORMAVIMOSI YDOS	20	63	83
Q02 Mikrocefalija	6	25	31
Q03.1 Dandy-Walker s.	0	2	2
Q03.9 Įgimta hidrocefalija, nepatikslinkta	7	16	23
Q04.0 Įgimtos didžiosios smegenų jungties formavimosi ydos	4	4	8
Q04.30 Kitos redukcinės galvos smegenų deformacijos	0	1	1
Q04.33 Smegenėlių redukcinės anomalijos	1	1	2
Q04.60 Įgimtos galvos smegenų cistos	0	1	1
Q04.9 Įgimtos galvos smegenų formavimosi ydos, nepatikslinktos	1	6	7
Q07.81 Įgimta optinė atrofija	1	6	7
<i>*Blyškiosios pertvaros anomalijos</i>	0	1	1
ĮGIMTOS AKIES, AUSIES, VEIDO IR KAKLO FORMAVIMOSI YDOS	50	186	236
Q10.0 Įgimta ptozė	1	4	5
Q11.2 Mikroftalmija	0	1	1
Q13.0 Rainelės koloboma	1	2	3
Q13.1 Aniridija	0	1	1
Q14.2 Regos nervo disko koloboma	0	1	1
Q15.0 Įgimta glaukoma	0	1	1
<i>*Įstriži žemyn vokų plyšiai</i>	4	3	7
<i>*Įstriži aukštyn vokų plyšiai</i>	2	5	7
<i>*Dystopia canthorum</i>	0	1	1
<i>*Epikantas</i>	1	24	25
<i>*Hipotelorizmas</i>	1	1	2
<i>*Trumpi vokų plyšiai</i>	0	10	10
Q18.3 Kaklo sparnelis	1	0	1
Q13.5 Melsvos skleros	1	7	8
Q17.0 Preaurikulinė išauga	2	1	3
Q17.1 Makrotija	0	17	17
Q17.3 Kitos ausies kaušelio deformacijos	1	19	20
Q17.4 Žemai prisitvirtinusios ausys	5	10	15
Q17.9 Įgimta ausies formavimosi yda, nepatikslinkta	14	32	46
<i>*Preaurikulinė fistulė</i>	0	2	2
Q18.4 Makrostomija	1	7	8

TLK kodas/*, įgimta anomalija
Anomalių skaičius

	Anomalių skaičius		
	KSP	Be KSP	Viso
<i>Q18.5 Mikrostomija</i>	2	3	5
<i>Q18.6 Makrocheilija</i>	5	11	16
<i>*Mikrogenija</i>	8	14	22
<i>Q18.80 Synophrys</i>	0	9	9
ĮGIMTOS KRAUJO APYTAKOS SISTEMOS FORMAVIMOSI YDOS	7	30	37
Q21.0 Skilvelių pertvaros defektas	2	3	5
Q21.1 Prieširdžių pertvaros defektas	3	10	13
Q22.1 Įgimta plautinio kamieno vožtuvo stenozė	1	2	3
Q22.8 Kitos įgimtos triburio vožtuvo formavimosi ydos	0	2	2
Q23.10 Dviburis aortos vožtuvas	0	1	1
Q23.3 Įgimtas dviburio (mitralinio) vožtuvo nesandarumas	0	5	5
Q24.8 Kitos įgimtos patikslintos širdies formavimosi ydos	1	3	4
Q25.1 Aortos koarktacija	0	2	2
<i>Q21.11 Atvira ovalioji anga</i>	0	2	2
ĮGIMTOS KVĖPAVIMO SISTEMOS FORMAVIMOSI YDOS	0	3	3
Q30.0 Choanų atrezija	0	1	1
Q35.7 Nesuaugęs liežuvėlis	0	2	2
KITOS ĮGIMTOS VIRŠKINIMO SISTEMOS FORMAVIMOSI YDOS	5	27	32
Q39.1 Stemplės atrezija su tracheozofagine fistule	0	1	1
Q41.2 Įgimtas klubinės žarnos nebuvimas, atrezija ir stenozė	0	1	1
Q42.3 Įgimtas išangės nebuvimas, atrezija ir stenozė be fistulės	0	1	1
Q44.7 Kitos įgimtos kepenų formavimosi ydos	0	1	1
<i>Q43.81 Funkciniai skrandžio ir žarnų sutrikimai</i>	0	1	1
<i>Q38.50 Aukštas skliautinis gomurys</i>	5	22	27
ĮGIMTOS LYTIES ORGANŲ FORMAVIMOSI YDOS	3	22	25
Q51.8 Kitos įgimtos gimdos ir gimdos kaklelio formavimosi ydos	1	0	1
Q54 Hipospadija	1	2	3
Q55.1 Sėklidės ir kapšelio hipoplazija	0	2	2
Q55.6 Kitos įgimtos varpos formavimosi ydos	0	4	4
<i>*Sėklidžių hidrocelė</i>	1	2	3
<i>*Varpos hipoplazija</i>	0	1	1
<i>Q53 Kriptorchizmas</i>	0	11	11
ĮGIMTOS ŠLAPIMO ORGANŲ SISTEMOS FORMAVIMOSI YDOS	0	2	2
Q63.00 Papildomas inkstas	0	2	2

TLK kodas/*, įgimta anomalija
Anomalių skaičius

	Anomalių skaičius		
	KSP	Be KSP	Viso
ĮGIMTOS RAUMENŲ IR SKELETO SISTEMOS FORMAVIMOSI YDOS BEI DEFORMACIJOS	57	211	268
Q65.1 Abipusė įgimta klubo sąnario dislokacija	0	3	3
Q65.81 Įgimta gūžduobės displazija	2	2	4
Q66.0 Į vidų iškrypusi „arklio pėda“, nepatikslinkta	0	4	4
Q68.2 Įgimta kelio sąnario deformacija	0	1	1
Q69.2 Papildomas kojos pirštas	0	1	1
Q69.9 Polidaktilija, nepatikslinkta	0	1	1
Q70.3 Kojos pirštų odos suaugimas	0	1	1
Q70.1 Paprastas rankos pirštų suaugimas be sinostozės	0	1	1
Q72.8 Kiti redukciniai kojos defektai	0	1	1
Q74.1 Įgimta kelio formavimosi yda	1	1	2
<i>*II-III pėdos pirštų sindaktilija</i>	2	6	8
<i>*Platus tarpas tarp I-II pėdos pirštų</i>	4	8	12
<i>*Kelių valgum deformacija</i>	1	4	5
Q74.81 Brachidaktilija	5	5	10
Q75.00 Vainikinė kraniosinostozė, brachicefalija	2	5	7
Q76.3 Įgimta skoliozė dėl įgimtų kaulinių deformacijų	0	1	1
Q76.4 Kitos stuburo formavimosi ydos, nesusijusios su skolioze	1	4	5
<i>Q66.4 Į išorę iškrypusi kulninė pėda</i>	2	1	3
<i>Q66.5 Plokščiapėdystė</i>	4	16	20
<i>Q66.6 Kitas įgimtas pėdos iškrypimas į išorę</i>	1	4	5
<i>Q66.9 Įgimta pėdos deformacija, nepatikslinkta</i>	0	3	3
<i>Q67.0 Veido asimetrija</i>	0	3	3
<i>Q67.2 Dolichocefalija</i>	1	3	4
<i>Q67.3 Plagiocefalija</i>	1	4	5
<i>Plokščias pakaušis</i>	1	2	3
<i>Q67.50 Įgimta skoliozė</i>	4	17	21
<i>Q67.6 Įdubusi krūtinė</i>	3	15	18
<i>Q67.7 Pleištiška krūtinė</i>	1	3	4
<i>Q67.8 Kitos įgimtos krūtinės ląstos deformacijos</i>	0	4	4
<i>Q68.0 Įgimta kreivakaklystė</i>	1	3	4
<i>Q68.10 Įgimtas kreivas pirštas</i>	9	35	44
<i>Q68.5 Įgimtas blauzdos ilgųjų kaulių išlinkimas, nepatikslinktas</i>	0	1	1
<i>Q75.2 Hipertelorizmas</i>	7	27	34
<i>Q75.3 Makrocefalija</i>	4	21	25
KITOS ĮGIMTOS FORMAVIMOSI YDOS	17	95	112

TLK kodas/*, įgimta anomalija	Anomalijų skaičius		
	KSP	Be KSP	Viso
Q84.3 Anonichija	0	1	1
Q82.5 Įgimtas nepiktybinis apgamas	0	4	4
Q82.80 Anomalios delno raukšlės (skersinė delno raukšlė)	4	11	15
Q83.3 Papildomas spenelis	1	6	7
Q84.20 Hipertrichozė	2	10	12
*Kirkšninė išvarža	3	6	9
*Galvos plaukų augimo krypties pokyčiai	1	10	11
*Cafė au lait dėmė	0	24	24
*Depigmentuota dėmė	0	4	4
*Hemangioma	0	5	5
*Dantų raidos defektai	0	1	1
*Sakralinė duobutė	2	10	12
*Bambinė išvarža	4	3	7
KITI FENOTIPINIAI YPATUMAI	89	343	432
IŠ VISO	248	982	1230

4.2.2 Pacientų su chromosominiais pokyčiais ir be jų klinikinių požymių palyginimo rezultatai

Norint įvertinti patogeninių kopijų skaičiaus pokyčių reikšmę asmenų, turinčių INN, klinikiniams požymiams, buvo palygintos dvi grupės tiriamųjų – pacientų, kuriems molekulinio kariotipavimo tyrimu nustatytas chromosominis pokytis (A grupė, 29 asmenys, turintys INN, 13,7 % visų pacientų, apibendrinta 4.1 lent.), ir pacientai be patogeninių kopijų skaičiaus pakitimų (B grupė, 182 asmenys, turintys INN, 86,3 % pacientų).

Iš 29-ių pacientų, kuriems molekulinio kariotipavimo tyrimu nustatytas patogeninis chromosominis pokytis, 17 (58,6 %) buvo berniukai, 12 (41,4 %) – mergaitės. Palyginus šiuos duomenis su pacientų grupe be patogeninių pokyčių, kurioje buvo 72,0 % berniukų ir 28,0 % mergaičių, statistiškai reikšmingo grupių skirtumo pagal lytį nenustatyta ($p > 0,05$).

Genealogijų analizės duomenimis, abiejose grupėse šeiminių (esant I eilės giminaičiui, turinčiam INN, šeimoje) ir sporadinių atvejų skaičius buvo panašus: A grupėje stebėta 96,6 % sporadinių atvejų ir 3,4 % šeiminių, B grupėje – 87,2 % atvejų

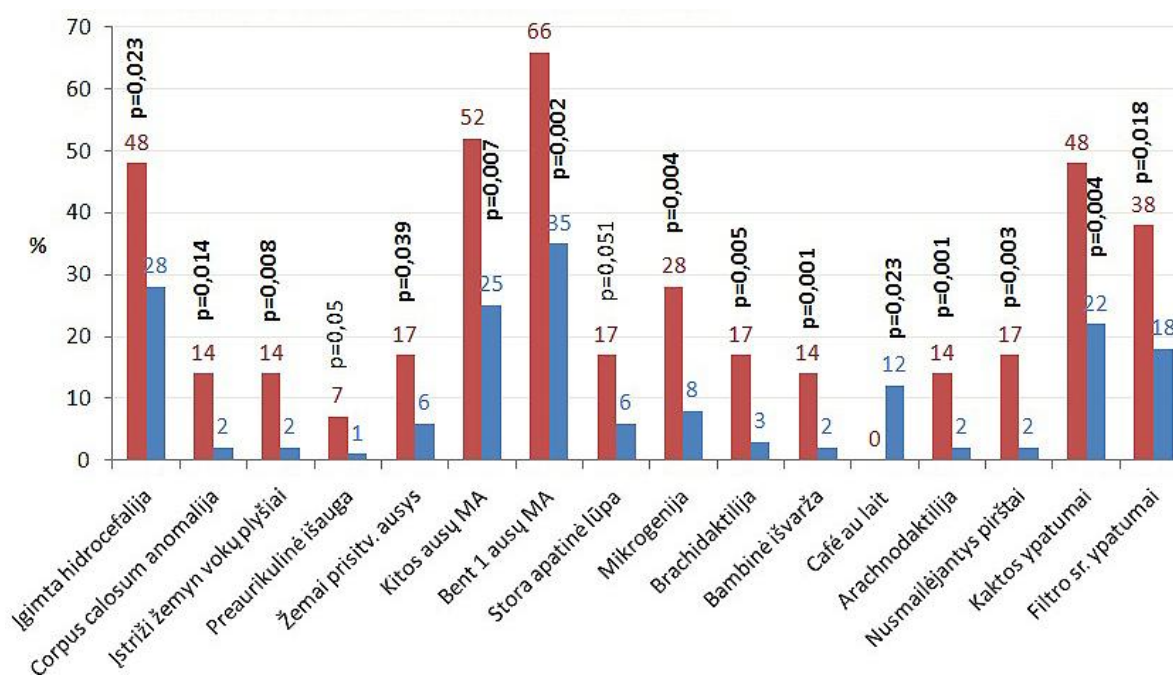
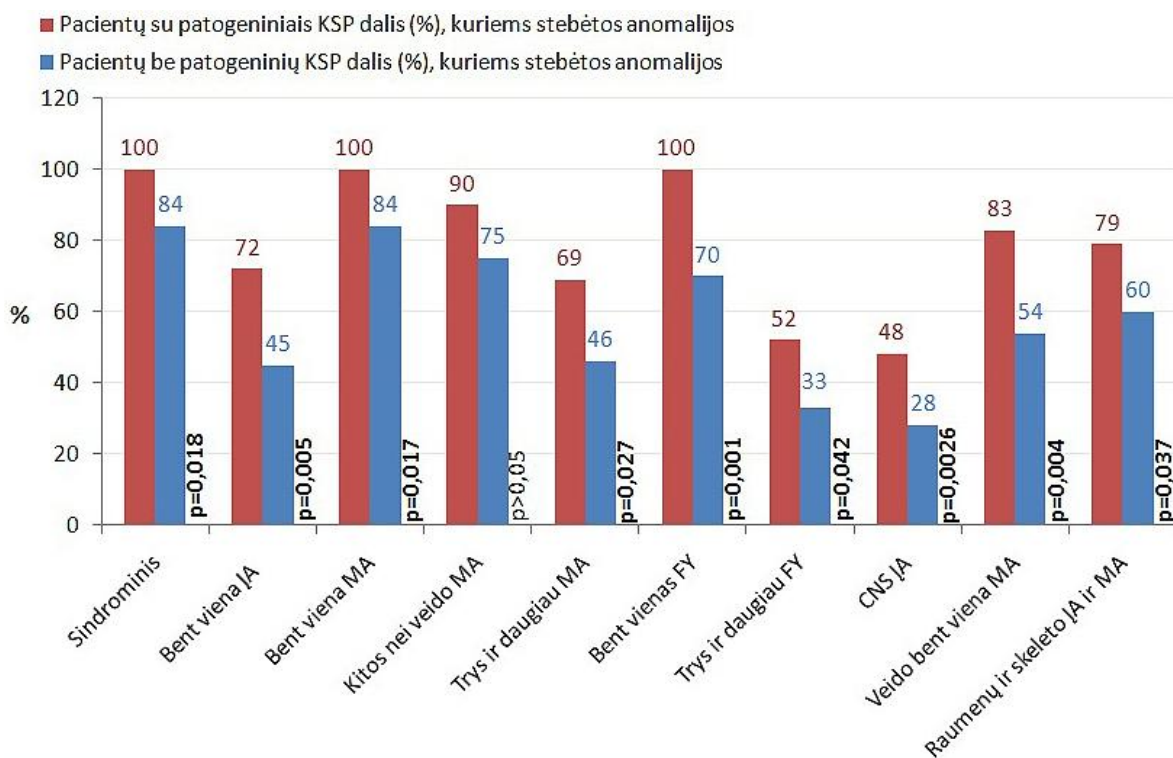
buvo sporadiniai ir 12,8 % – šeiminiai. Statistinis skirtumas tarp grupių nereikšmingas ($p>0,05$).

Daugiausia tiriamųjų tiek A, tiek B grupėse buvo gimę išnešioti (nuo 38 iki 39 sav. + 6 d.). Statistinio skirtumo, lyginant šias dvi grupes pagal gestacinį laiką, nenustatyta ($p>0,05$). Be to, dauguma tirtų pacientų tiek su patogeniniais chromosominiais persitvarkymais grupėje, tiek grupėje pacientų su normaliu molekulinio kariotipavimo rezultatu, buvo gimę natūraliais gimdymo takais (atitinkamai 73,9 % ir 71,3 %). Statistinis skirtumas tarp grupių šiuo atžvilgiu nereikšmingas ($p>0,05$). Pacientų su chromosominiais pokyčiais grupėje kiek dažniau nei pacientams be chromosominių pakitimų bent vienas iš Apgar įvertinimų buvo <9 (atitinkamai 47,1 % ir 41,5 %), tačiau statistiškai šis skirtumas nereikšmingas ($p>0,05$).

Reikšmingų skirtumų nenustatyta ($p>0,05$) lyginant A ir B grupių pacientus pagal jų antropometrinius duomenis (ūgį, svorį, galvos apimtį gimus ir paskutinės apžiūros metu registruotą ūgį, svorį, ūgio/ svorio priklausomybę, galvos apimtį). Statistiškai nereikšmingas pacientų pasiskirstymas analizuotose grupėse pagal protinio atsilikimo ir raidos atsilikimo laipsnį bei motorinės raidos atsilikimo, hipotonijos, autizmo, epilepsijos ir kitų neurologinių požymių pasireiškimą ($p>0,05$).

Statistiškai reikšmingas skirtumas gautas lyginant pacientų grupes su patogeniniais chromosominiais pokyčiais ir be patogeninių kopijų skaičiaus pakitimų klininius duomenis pagal kitų fizinių požymių, elgesio arba neuroginių sutrikimų pasireiškimą kartu su INN (t. y. sindrominė INN), kuris dažniau stebėtas pacientams su patogeniniais chromosominiais pokyčiais (4.2 pav.). Sindrominių INN atvejų A grupėje – 29 (100 %), B grupėje – 152 (83,5 %), $p=0,018$.

Palyginus pacientus su patogeniniais chromosominiais pokyčiais ir be jų, pastebėta, kad bent viena įgimta anomalija statistiškai reikšmingai dažniau buvo asmenims su patogeniniais kopijų skaičiaus pokyčiais: A grupėje 72,4 %, B grupėje – 45,1 % pacientų ($p=0,005$). Bent viena mikroanomalija nustatyta 84,1 % pacientų, kurių molekulinio kariotipavimo rezultatas buvo normalus, ir visiems pacientams (100 %) su chromosominiais pokyčiais, šis skirtumas statistiškai reikšmingas ($p=0,01$). Kitų nei veido mikroanomalijų dažnis A ir B grupės pacientams buvo pana-



4.2 pav. Asmenų su patogeniniais kopijų skaičiaus pokyčiais (KSP) ir tiriamųjų, kuriems molekulinio kariotipavimo tyrimu patogeninių chromosominių pokyčių nenustatyta, klinikinių duomenų analizės rezultatų palyginimas.

šus: bent viena kita nei veido mikroanomalija stebėta 89,7 % A grupės pacientų ir 74,7 % B grupės pacientų ($p>0,05$). Statistiškai reikšmingai dažniau pacientams su patogeniniais kopijų skaičiaus pokyčiais buvo trys ir daugiau mikroanomalijų (69 % A grupės ir 45,6 % B grupės pacientų), $p=0,016$.

Įgimtų nervų sistemos formavimosi ydų statistiškai reikšmingai dažniau diagnozuota pacientams su patogeniniais kopijų skaičiaus variantais: A grupėje – 48,3 %, B grupėje – 28 % tiriamųjų ($p=0,026$). Dažniau įgimta hidrocefalija buvo nustatyta pacientams su chromosominiais pokyčiais (24,1 % A grupėje, 8,8 % B grupėje, $p=0,023$). Didžiosios smegenų jungties formavimosi yda, lyginant pacientus su patogeniniais kopijų skaičiaus variantais ir be jų, statistiškai reikšmingai dažniau diagnozuota taip pat asmenims su teigiamais molekulinio kariotipavimo tyrimo rezultatais (13,8 % A grupėje, 2,2 % B grupėje, $p=0,014$).

Bent viena iš įgimtų akies, ausies, veido ir kaklo anomalijų arba mikroanomalijų buvo nustatyta 82,8 % pacientų su patogeniniais kopijų skaičiaus variantais ir 54,5 % pacientų su normaliu molekulinio kariotipavimo tyrimo rezultatu, skirtumas statistiškai reikšmingas ($p=0,003$). Akivaizdu, kad šį skirtumą lėmė ne įgimtų anomalijų, bet mikroanomalijų didesnis dažnis pacientų su patogeniniais chromosominiais pokyčiais grupėje: lyginant A ir B grupes tik pagal įgimtų akies, ausies, veido ir kaklo anomalijų skaičių, reikšmingo skirtumo nenustatyta ($p>0,05$), o bent viena iš akies, ausies, veido ir kaklo mikroanomalijų reikšmingai dažniau nustatyta pacientams su patogeniniais chromosominiais pokyčiais (A grupėje – 82,8 %, B grupėje – 54,4 %, $p=0,003$). Lyginant A ir B grupes pagal įgimtas akies, ausies, veido ir kaklo anomalijas, reikšmingų skirtumų nepastebėta, tačiau jos statistiškai reikšmingai skyrėsi pagal keletą mikroanomalijų. Pacientams su patogeniniais kopijų skaičiaus pakitimais reikšmingai dažniau stebėti įstriži žemyn vokų plyšiai: A grupėje – 13,8 %, B grupėje – 1,6 % asmenų ($p=0,008$). Preaurikulinė išauga taip pat dažniau nustatyta pacientams su chromosominiais pokyčiais (6,9 % A grupėje ir 0,5 % B grupėje), $p=0,05$ – artėjama prie statistinio reikšmingumo. Pacientams su patogeniniais kopijų skaičiaus variantais buvo dažniau pastebėtos žemai prisitvirtinusios ausys (17,2 % A grupėje ir 5,5 % B grupėje, $p=0,039$) ir kitos (nepatikslintos) ausų mikroanomalijos ir deformacijos (51,7 % A grupėje ir 25,3 % B

grupėje, $p=0,005$). Bent viena ausų mikroanomalija (preaurikulinė išauga, makrotija, žemai prisitvirtinusios ausys, kita (nepatikslinta) ausų mikroanomalija ar deformacija) reikšmingai dažnesnė pacientams su chromosomine patologija (65,5 % A grupėje ir 34,6 % B grupėje, $p=0,002$). Pacientams su patogeniniais kopijų skaičiaus pokyčiais daugiau nei tris kartus dažniau pastebėta stora apatinė lūpa (17,2 % A grupėje ir 6,0 % B grupėje), tačiau statistinis reikšmingumas nenustatytas ($p=0,051$). Pagal burnos mikroanomalijas (mikrostomija, makrostomija, makrocheilija) reikšmingo skirtumo tarp grupių nepastebėta. Pacientų su chromosominiais pokyčiais grupėje reikšmingai dažnesnė mikrogenija: šios mikroanomalijos dažnis A grupėje – 27,6 %, B grupėje – 7,7 % ($p=0,004$).

Įgimtos raumenų ir skeleto sistemos anomalijos ir mikroanomalijos buvo dažnesnės pacientams su chromosomine patologija (79,3 % A grupėje, 60,4 % B grupėje) ir šis skirtumas yra statistiškai reikšmingas ($p=0,037$). Tiek bendras šios sistemos įgimtų anomalijų, tiek mikroanomalijų dažnis buvo didesnis A grupėje, tačiau statistiškai nereikšmingas. Reikšmingai dažniau pacientams su patogeniniais kopijų skaičiaus pokyčiais stebėta brachidaktilija (17,2 % A grupės, 2,7 % B grupės pacientų, $p=0,005$). Lyginant A ir B pacientų grupes pagal į išorę iškrypusios kulninės pėdos dažnį, stebėta, kad ši anomalija dažnesnė pacientų su chromosomine patologija grupėje, tačiau skirtumas statistiškai nereikšmingas ($p=0,05$).

Analizuojant kitas įgimtas formavimosi ydas nustatyta, kad pacientams su patogeniniais kopijų skaičiaus pokyčiais statistiškai reikšmingai dažniau diagnozuota bambinė išvarža (13,8 % pacientų A grupėje ir 1,6 % B grupėje, $p=0,008$). *Café au lait* dėmės stebėtos tik pacientams be patogeninių chromosominių pokyčių: A grupės pacientams *Café au lait* dėmių nebuvo, B grupėje šios dėmės pastebėtos 13,2 % pacientų. Šis skirtumas statistiškai reikšmingas ($p=0,023$). Reikšmingo skirtumo nenustatyta lyginant pacientų su patogeniniais chromosominiais pokyčiais ir be jų grupes pagal įgimtų kraujo apykaitos, kvėpavimo, virškinimo, šlapimo sistemų bei lyties organų formavimosi ydų dažnius.

Visiems pacientams su chromosomine patologija buvo nustatytas statistiškai reikšmingas bent vienas fenotipinis ypatumas, o šių požymių pacientų be patogeninių kopijų pokyčių grupėje buvo stebima 69,8 % asmenų ($p=0,000$). Be to, pacientams su

chromosominiais pokyčiais dažniau nei pacientams su normaliu molekulinio kariotipavimo tyrimo rezultatu nustatyta trys ir daugiau fenotipinių ypatumų (A grupėje – 51,7 %, B grupėje – 33 % pacientų). Šis skirtumas yra statistiškai reikšmingas ($p=0,042$). Vienas iš fenotipinių ypatumų, reikšmingai dažniau pastebėtas pacientams su patogeniniais chromosominiais pokyčiais – arachnodaktilija. Ji nustatyta 13,8 % A grupės pacientų ir 1,6 % B grupės pacientų ($p=0,008$). Nusmailėjantys pirštai taip pat charakteringesni chromosominei patologijai, šis požymis būdingas 17,2 % pacientų su patogeniniais kopijų skaičiaus pokyčiais ir tik 2,2 % pacientų su normaliu molekulinio kariotipavimo tyrimo rezultatu ($p=0,003$). Kaktos ypatumai (aukšta, žema, iškili, siaura, plati) buvo dažnesni pacientams su patogeniniais chromosominiais pokyčiais (48,3 % A grupės, 22 % B grupės asmenims, $p=0,004$). Filtro srities ypatumai (ilgas, trumpas, plokščias, gilus) reikšmingai dažniau pažymėti A grupės pacientų fenotipų aprašymuose, lyginant su B grupe (atitinkamai 37,9 % ir 18,1 % pacientų, $p=0,018$).

Atlikus koreliacijos analizę nustatyta, kad trys ir daugiau fenotipinių ypatumų dažniau stebėti esant bent vienai įgimtai anomalijai pacientams su patogeniniu chromosominiu pokyčiu ($r=0,484$, $p=0,008$). Bent vienos įgimtos anomalijos ir trijų ar daugiau mikroanomalijų reikšmingos teigiamos koreliacijos šioje pacientų grupėje nenustatyta, tačiau silpna koreliacija pastebėta pacientams be chromosominių pokyčių ($r=0,213$, $p=0,004$).

Nustatyta įgimtų nervų sistemos formavimosi ydų ir bent vienos įgimtos akies, ausies, veido ar kaklo mikroanomalijos silpna reikšminga koreliacija pacientams be patogeninių chromosominių pokyčių ($r=0,154$, $p=0,038$). Pacientų su patogeniniais kopijų skaičiaus pokyčiais grupėje įgimtos nervų sistemos formavimosi ydos reikšmingai neigiamai koreliavo su bent vienos raumenų ir skeleto sistemos mikroanomalijos pasireiškimu ($r=-0,529$, $p=0,003$). Akies, ausies, veido ar kaklo bent vienos mikroanomalijos pasireiškimas reikšmingai koreliavo su įgimtomis raumenų ir skeleto sistemų formavimosi ydomis bei deformacijomis pacientų be chromosominių pokyčių grupėje ($r=0,229$, $p=0,002$).

Duomenų stratifikavimas

Analizuota, kaip patogeninio chromosominio pokyčio ir fenotipinio požymio ryšys pasikeistų, atsižvelgus į lytį, motorinės raidos atsilikimo, epilepsijos, mikrocefalijos ar makrocefalijos pasireišimą. Suskirsčius duomenis į stratas pagal pacientų lytį, nustatyta, kad chromosominės patologijos ir analizuotų fenotipinių požymių asociacija vienoda tiek vyriškos, tiek moteriškos lyties asmenims. Analogiška situacija gauta stratifikavus duomenis pagal motorinės raidos atsilikimą – nepriklausomai nuo to, ar motorinė raida buvo sutrikusi, ar normali, chromosominių pokyčių ir fenotipinių požymių ryšys išliko nepakitęs.

Išskyrus pacientų su epilepsija ir be epilepsijos stratas, nustatyta, kad įstriži žemyn vokų plyšiai buvo tik tiems pacientams, kuriems epilepsija nepasireiškė, t. y. iš 21 paciento, kuriems nėra epilepsijos ir molekulinio kariotipavimo tyrimu nustatytas patogeninis kopijų skaičiaus variantas, 19 % stebėti įstriži žemyn vokų plyšiai, tačiau nei vienam iš 8 pacientų su epilepsijos diagnoze ir chromosominiu pokyčiu, įstrižų žemyn vokų plyšių, nebuvo. Abiejose stratosose nustatyti reikšmingi skirtumai pagal vokų plyšių įstrižumą lyginant pacientus su patogeniniu chromosominiu pokyčiu ir su normaliu molekulinio kariotipavimo tyrimo rezultatu ($p=0,007$). Gautas reikšmingas homogeniškumo testas ($p=0,000$) ir reikšmingas Mantel-Haenszel testas ($p=0,004$). Įvertinus šansų santykius nustatyta, kad įstrižų žemyn vokų plyšių buvimas chromosominio pokyčio riziką didina 10,2 karto pacientams, kuriems epilepsija nepasireiškė (PI [2,1 – 49,5]).

Stratifikavus duomenis į dvi stratas pagal tai, ar paskutinės apžiūros metu paciento galvos apimtis buvo normali, ar stebėta mikrocefalija/ makrocefalija, gauti keli reikšmingi rezultatai. Fenotipinis požymis brachidaktilija, kuris ankstesnės analizės metu buvo reikšmingai susietas su chromosomine patologija, buvo stebėtas tik stratoje pacientų su normalia galvos apimtimi: iš 20 pacientų su chromosominiu pokyčiu ir normalia galvos apimtimi, 25 % buvo brachidaktilija, vis dėlto šis požymis nepasireiškė nei vienam pacientui su chromosomine patologija ir mikrocefalija arba makrocefalija. Reikšmingi skirtumai pagal brachidaktiliją lyginant pacientus su patogeniniu chromosominiu pokyčiu ir su normaliu molekulinio kariotipavimo tyrimo rezultatu, nustatyti abiejose stratosose ($p=0,004$). Gautas reikšmingas homogeniškumo

testas ($p=0,000$) ir reikšmingas Mantel-Haenszel testas ($p=0,002$). Pagal šansų santykio įvertį lyginant pacientus, kurių galvos apimtis normali, su tais, kuriems nustatyta makrocefalija arba mikrocefalija, brachidaktilijos pasireiškimas didina chromosominio pokyčio riziką 8,7 kartų pacientams su normalia galvos apimtimi (PI [2,2 – 33,7]).

Mikrocefalija arba makrocefalija taip pat nebūdingas požymis tirtiems pacientams su bambine išvarža. Mantel-Haenszel įvertis lyginant stratas pagal šį fenotipinį požymį buvo 0,003. Taigi bambinės išvaržos buvimas didina chromosominio pokyčio riziką 11,1 kartų pacientams, kurių galvos apimtis normali, lyginant su tais, kuriems nustatyta mikrocefalija arba makrocefalija (PI [2,2 – 54]).

Suskirstymas į stratas pagal galvos apimtį taip pat reikšmingas vertinant teigiamo molekulinio kariotipavimo tyrimo rezultato ir bent vienos įgimtos anomalijos pasireiškimo asociaciją. Nustatyta, kad iš 20 pacientų, kuriems nustatyta chromosominė patologija ir normali galvos apimtis, 75 % asmenų yra bent viena įgimta anomalija. Tuo tarpu iš 9 pacientų su patogeniniais chromosominiais pokyčiais ir makrocefalija ar mikrocefalija, bent viena įgimta anomalija nustatyta 66,7 % asmenų. Statistiškai reikšmingai bent viena įgimta anomalija dažniau pasitaiko pacientams su chromosomine patologija tik pacientų su normalia galvos apimtimi stratoje ($p=0,001$). Gautas reikšmingas homogeniškumo testo rezultatas ($p=0,016$) ir statistiškai reikšminga Mantel-Haenszel įvertimo reikšmė (0,014). Įvertinus šansų santykius nustatyta, kad lyginant pacientus su normalia galvos apimtimi ir mikrocefalija/ makrocefalija, chromosominės patologijos rizika esant bent vienai įgimtai anomalijai, 2,9 karto didesnė asmenims su normalia galvos apimtimi (PI [1,2 – 6,7]).

Prognozuojamų rizikos veiksnių nustatymas

Į daugiamatės logistinės regresijos modelį įtrauktos visos anomalijos arba anomalijų grupės, pagal kurias buvo nustatytas reikšmingas skirtumas lyginant pacientų su patogeniniais kopijų skaičiaus pokyčiais grupę su pacientų grupe, kurioje patogeninių pokyčių molekulinio kariotipavimo tyrimu nenustatyta. Logistinės regresijos modeliai buvo neefektyvūs, kai nepriklausomais kintamaisiais pasirinkti: (1) sindrominis

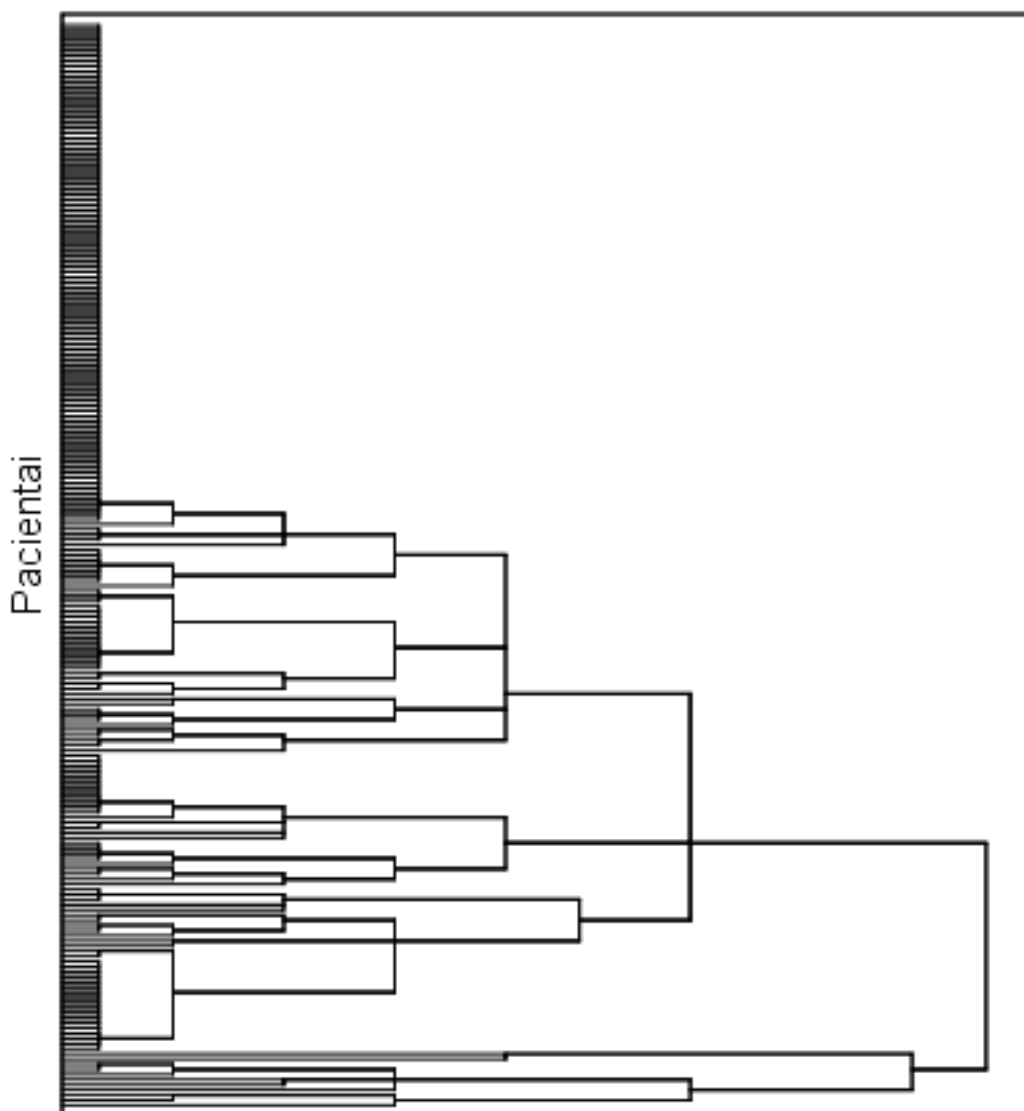
atvejis/ pacientui nustatyta bent viena įgimta anomalija/ bent viena mikroanomalija/ bent vienas fenotipinis ypatumas ir (2) tiriamajam stebėta bent viena įgimta nervų sistemos formavimosi yda/ bent viena veido mikroanomalija/ bent viena įgimta raumenų ir skeleto sistemos formavimosi yda ar deformacija.

Nepriklausomais kintamaisiais įtraukus atskirus fenotipinius požymius (įgimta didžiosios smegenų jungties formavimosi yda, įgimta hidrocefalija, įstriži žemyn vokų plyšiai, ausų mikroanomalijos, mikrogenija, makrocheilija, brachidaktilija, babinė išvarža, balintos kavos dėmė, arachnodaktilija, filtro srities ypatumai, kaktos ypatumai, nusmailėjantys pirštai), gautas efektyvus daugiamatės logistinės regresijos modelis, kuris išgrynintas, paliekant tris nepriklausomus prognostinius rizikos veiksnius, patikimai prognozuojančius patogeninio chromosominio pokyčio nustatymą: įgimta didžiosios smegenų jungties formavimosi yda, ausų mikroanomalijos ir brachidaktilija (4.3 lent.). Įgimtos didžiosios smegenų jungties ydos prognostinis reikšmingumas yra didžiausias, t. y. ji didina patogeninio chromosominio pokyčio nustatymo tikimybę 8,5 karto. Brachidaktilija riziką didina 7,4 karto, ausų mikroanomalijos – 3,5 karto.

4.3 lentelė. Daugiamatės logistinės žingsninės regresijos rezultatai.

Nepriklausomas kintamasis	p reikšmė	Exp(B)	Tikimybių santykis
			(95 proc. PI)
Įgimta didžiosios smegenų jungties formavimosi yda	0,006	8,450	1,828-39,070
Ausų mikroanomalijos	0,006	3,489	1,469-8,286
Brachidaktilija	0,004	7,399	1,860-29,429

Klasifikavimo medyje – dendogramoje matyti, kad į analizę įtraukiant visas anomalijas, pagal kurias buvo nustatytas reikšmingas skirtumas, išsiskiria atskiri klasteriai (4.3 pav.). Tai besiskiriančios pagal fenotipinius požymius pacientų grupės, rodančios, kad pacientų, turinčių INN, imtis nėra homogeniška.



4.3 pav. Pacientų su chromosominiais pokyčiais ir be jų grupių atsiskyrimas pagal fenotipinius požymius. Klasterių sujungimui taikytas tolimiausių kaimynų metodas.

Rezultatų aptarimas

Chromosominiai pokyčiai yra dažniausia šiandien žinoma INN priežastis. Tačiau nepaisant molekulinio kariotipavimo technologijų efektyvumo ir plataus taikymo diagnostikoje, ne visuose medicininės genetikos centruose yra galimybė atlikti šį tyrimą kiekvienam pacientui, turinčiam INN. Tokiais atvejais svarbi tinkama pacientų atranka molekulinio kariotipavimo tyrimui, užtikrinanti didelį molekulinio kariotipavimo technologijų diagnostinį efektyvumą.

Šiam tyrimui buvo atrinkti pacientai su nežinomos etiologijos tiek sindromine, tiek nesindromine INN. Kitų klinikinių požymių būvimas ar INN sunkumo laipsnis

neįtakoją pacientų atrankos molekuliniam kariotipavimui. Tai patvirtina keletas imčių charakterizuojančių rodiklių. Pavyzdžiui, mikrocefalija buvo nustatyta 14,7 % tiriamųjų. Didelės apimties pacientų, turinčių INN, studijose Pietų Karolinoje ir Olandijoje mikrocefalijos dažnis buvo panašus, atitinkamai 26 % ir 12 % (75, 76). Be to, didesnei daliai šiame moksliniame tyrime dalyvavusių pacientų, nebuvo stebėta specifinių dismorfinių požymių: trys ir daugiau dismorfinių požymių buvo nustatyti 48,8 % tiriamųjų. Palyginimui, Vries ir kitų tyrime trys ir daugiau dismorfinių požymių buvo nustatyti 48 % pacientų (73), Olandų tyrime – 31 % tiriamųjų (75). Intelektinės negalios laipsnis taip pat nebuvo įtrauktas į pacientų atrankos kriterijus, tyrime dalyvavo asmenys, kurių IQ buvo <70 neatsižvelgiant, ar INN lengva, ar gili. Taigi tiriamųjų imtis nebuvo selektyvi ir, tikėtina, parodė bendrą pacientų, turinčių INN, populiaciją.

Nors molekulinio kariotipavimo tyrimams naudoti keli skirtingi lustai, daugumai pacientų buvo atlikti didelės skiriamosios gebos tyrimai (201/211). Pacientus tiriant didelės rezoliucijos molekulinio kariotipavimo tyrimu, nedideli patogeniniai kopijų skaičiaus pokyčiai (<500 kb) buvo nustatyti 1 % tiriamųjų (2/201). Taigi tikimybė, kad likusiems 10 tiriamųjų, kuriems buvo atliktas mažos rezoliucijos vLGH tyrimas, buvo neaptiktas mažas patogeninis kopijų skaičiaus pokytis yra apie 0,1 % ir ji buvo vertinta kaip nereikšminga.

Palyginus tiriamųjų grupę su chromosominiais pokyčiais ir grupę asmenų, kuriems molekulinio kariotipavimo tyrimu patologijos neaptikta, buvo norima chromosominiams pokyčiams nustatyti specifinius klinikinius požymius. Etiologinė INN diagnozė molekulinio kariotipavimo tyrimu buvo nustatyta 29 pacientams, jiems aptikti chromosominiai pokyčiai įvairavo savo dydžiu ir buvo suskirstyti į tris grupes – žinomų sindromų, naujų patogeninių kopijų skaičiaus pokyčių ir nesubalansuotų translokacijų/ kitų sudėtingų persitvarkymų. Nedidelė dalis jų buvo siejami su monogeninėmis būklėmis (del5q35.3, del2p16.1-22.1, del4q28.3). Atliekant statistinę analizę, ši grupė pacientų nebuvo išskirta į smulkesnes kategorijas dėl mažo tiriamųjų skaičiaus. Klinikinių požymių palyginimas buvo atliekamas su kontroline grupe pacientų, kurių etiologinė INN diagnozė liko nežinoma atlikus molekulinio kariotipavimo tyrimus. Pastarųjų pacientų galima INN etiologija – monogeniniai,

epigenetiniai, daugiaveiksniai arba kiti (nežinomi) genetiniai veiksniai, tačiau ne chromosominiai pakitimai. Išsamesnė informacija apie kontrolinės grupės asmenų INN etiologines priežastis ir pacientų su chromosominiais pokyčiais suskirstymas į kategorijas pagal pokyčio dydį ir patogenetinį poveikį būtų tikslingas, norint gauti specifiškesnius rezultatus, tačiau šio tyrimo metu tai nebuvo įmanoma dėl duomenų stokos.

Šio mokslinio darbo rezultatai atskleidė pacientų, kuriems molekulinio kariotipavimo tyrimu nustatytas patogeninis kopijų skaičiaus pokytis, klinikinių požymių ypatumus, lyginant su pacientais, kuriems chromosominių pakitimų neaptikta. Nustatyta, kad pacientams su chromosomine patologija statistiškai reikšmingai dažniau INN buvo sindrominė. Be to, šiems pacientams dažniau buvo nustatyta bent viena įgimta anomalija, bent viena mikroanomalija, trys ir daugiau mikroanomalijų, bent vienas fenotipinis ypatumas bei trys ir daugiau fenotipinių ypatumų. Pacientams su chromosominiais pokyčiais lyginant su pacientais, kurių INN etiologija nežinoma, bent vienos įgimtos anomalijos buvimas reikšmingai teigiamai koreliavo su trijų ar daugiau fenotipinių ypatumų pasireiškimu. Analizuojant atskirų organų sistemų įgimtų anomalijų ir mikroanomalijų dažnius, nustatyta, kad pacientams su patogeniniais kopijų skaičiaus pokyčiais statistiškai reikšmingai dažnesnės nervų sistemos formavimosi ydos, įgimtos raumenų ir skeleto sistemos anomalijos ir mikroanomalijos bei bent viena iš įgimtų akies, ausies, veido ar kaklo mikroanomalijų. Kitų nei veido mikroanomalijų dažnis buvo panašus tiek pacientams su chromosominiais pokyčiais, tiek be jų. Tiriamųjų su patogeniniais kopijų skaičiaus pokyčiais grupėje įgimtos nervų sistemos formavimosi ydos reikšmingai neigiamai koreliavo su bent vienos raumenų ir skeleto sistemos mikroanomalijos pasireiškimu. Nustatyti statistiškai reikšmingi skirtumai lyginant grupes pagal konkrečių fenotipinių požymių buvimą: pacientams su chromosominiais pokyčiais dažnesnė hidrocefalija, didžiosios smegenų jungties formavimosi yda, įstriži žemyn vokų plyšiai, ausų mikroanomalijos (ypatingai žemai prisitvirtinusios ausys, preaurikulinė išauga, kitos ausų mikroanomalijos ir deformacijos), mikrogenija, brachidaktilija, baminė išvarža, arachnodaktilija, nusmailėjantys pirštai, kaktos ypatumai (aukšta, žema, iškili, siaura, plati) bei filtro srities ypatumai (ilgas, trumpas, plokščias, gilus). Stratifikuojant

duomenis pagal epilepsiją, nustatyta, kad chromosominio pokyčio rizika pacientams su įstrižais žemyn vokų plyšiais yra didesnė, kai epilepsijos diagnozė nenustatyta. Duomenų stratifikavimas pagal mikrocefalijos arba makrocefalijos buvimą atskleidė, kad chromosominio pokyčio rizika pacientams su normalia galvos apimtimi esant brachidaktilijai yra didesnė 8,7 karto, bambinei išvaržai – 11,1 karto, bent vienai įgimtai anomalijai – 2,9 karto. Taigi reikšmingų skirtumų nustatymas lyginant tiriamųjų su chromosominiais pokyčiais ir asmenų su nežinomos etiologijos INN klinikinius požymius leido sudaryti efektyvų daugiamatės logistinės regresijos modelį – jį naudojant, pagal specifinių fenotipinių požymių buvimą galima prognozuoti riziką, kad pacientui bus nustatytas patogeninis chromosominis pokytis molekulinio kariotipavimo tyrimu. Nepriklausomais kintamaisiais įtraukus atskirus fenotipinius požymius, gauti trys nepriklausomi prognostiniai rizikos veiksniai: įgimta didžiosios smegenų jungties formavimosi yda, ausų mikroanomalijos ir brachidaktilija, didinantys patogeninio kopijų skaičiaus nustatymo riziką atitinkamai 8,5, 3,5 ir 7,4 karto.

Iki šiol pagrindiniai chromosominės patologijos indikatoriai buvo INN, intrauterinis ir postnatalinis augimo atsilikimas, specifinio dismorfinių požymių spektro pasireiškimas ir raidos defektai (45). Schinzel duomenimis, kai kurie raidos defektai pasitaiko dažniau esant autosominių chromosomų pokyčiams, pavyzdžiui, stemplės atrezija, omfalocelė, kai kurios galvos smegenų įgimtos anomalijos ir kt. 2001 m. Vries ir kiti (73) publikavo 29 pacientų, turinčių INN, ir subtelomeriniais chromosominiais pokyčiais bei 110 kontrolinės grupės asmenų (turinčių INN ir normaliais kariotipo bei subtelomerinio FISH tyrimo rezultatais) klinikinių duomenų palyginimo rezultatus ir pateikė pacientų, turinčių INN, atrankos subtelomeriniam FISH tyrimui kriterijus. Tyrėjai nustatė, kad pacientams su subtelomeriniais chromosominiais pokyčiais statistiškai reikšmingai dažniau nei kontrolinės grupės asmenims pasireiškė prenatalinis augimo atsilikimas ir INN dažniau buvo šeiminė. Be to, pacientams su subtelomeriniais pokyčiais dažniau pasireiškė (>30 %) mikrocefalija, žemas ūgis, hipertelorizmas, nosies ir ausies anomalijos, rankų anomalijos ir kriptorchizmas, tačiau lyginant su kontroline grupe, reikšmingų skirtumų nenustatyta pagal nė vieną iš jų. Vadovaujantis šiais rezultatais, tyrėjai

pasiūlė pacientų, turinčių INN, atrankos subtelomeriniam FISH tyrimui kriterijus, tai prenatalinis augimo atsilikimas, teigiama šeimos anamnezė pagal INN, postnatalinis augimo sutrikimas, du ir daugiau dismorfinių veido požymių, vienas ir daugiau ne veido dismorfinių požymių/ įgimtų anomalijų.

2012 m. Shoukier ir kiti (77) pateikė 342 pacientų, turinčių INN, tirtų vLGH tyrimu, klinikinių ir molekulinį duomenų retrospektyvinės analizės rezultatus. Palyginus grupę pacientų su žinomais mikrodeleciniais/ mikroduplicaciniais sindromais ir nesubalansuotomis translokacijomis (n=45) ir pacientus, kuriems atlikus molekulinio kariotipavimo tyrimą, INN etiologija liko nežinoma (kontrolinė grupė, n=270), nustatyta, kad tiriamiesiems su chromosomine patologija statistiškai reikšmingai dažniau diagnozuota bet kokia įgimta anomalija bei įgimta širdies yda. Pacientams su patogeniniais kopijų skaičiaus pokyčiais taip pat dažniau nei kontrolinei grupei nustatyta pirminė mikrocefalija, žemas ūgis ir mažas svoris paskutinės apžiūros metu, tačiau šie skirtumai nebuvo statistiškai reikšmingi. Tyrėjai nenurodo, ar buvo analizuoti kitų įgimtų anomalijų ir mikroanomalijų dažniai lyginamosiose grupėse.

Šiuo tyrimu atlikta pacientų, turinčių INN, klinikinių ir molekulinį duomenų analizė papildė mokslines žinias apie pacientų su chromosominėmis aberacijomis fenotipinius ypatumus. Duomenys apie specifinį dismorfinių požymių ir įgimtų anomalijų spektrą, būdingą pacientams su patogeniniais kopijų skaičiaus pokyčiais, gali būti naudingi, norint atrinkti pacientus molekulinio kariotipavimo tyrimui ir pagerinti šio tyrimo diagnostinį efektyvumą.

4.3 PACIENTŲ SU UNIKALIAIS PATOGENINIAIS KOPIJŲ SKAIČIAUS POKYČIAIS GENOTIPO-FENOTIPO RYŠIO ANALIZĖ IR GENŲ KANDIDATŲ INTELEKTINEI NEGALIAI BEI KITIEMS KLINIKINIAMS POŽYMIAMS NUSTATYMAS

Šioje dalyje aprašyti trijų unikalių patogeninių kopijų skaičiaus pokyčių atvejų genotipo-fenotipo ryšio analizės rezultatai, gauti analizuojant tirtų pacientų klinikinius duomenis, literatūros šaltiniuose aprašytus klinikinius atvejus ir bendradarbiaujant su kitų šalių gydytojais genetikais, naudojant DECIPHER duomenų bazę. Chromosominiai pokyčiai genotipo-fenotipo ryšio analizei pasirinkti iš naujų patogeninių kopijų skaičiaus pokyčių grupės dėl jų lemiamų klinikinių požymių specifiškumo ir nedidelio pokyčio dydžio. Analizuojant pacientų su panašiais chromosominiais pokyčiais klinikinę informaciją, charakterizuoti šiems naujiems patogeniniams kopijų skaičiaus pokyčiams būdingi fenotipiniai požymiai, susiaurintos kritinės INN genominės sritys, nustatyti INN genai kandidatai.

4.3.1 Klinikinis ir molekulinis 7p22.1 mikroduplicacijos apibūdinimas

Vienas iš naujų patogeninių kopijų skaičiaus pokyčių, nustatytų atlikus molekulinio kariotipavimo tyrimus pacientams, turintiems INN, buvo 7p22.1 mikroduplicacija. Pateikiama šios pacientės ir kitų pacientų, aprašytų literatūroje ir DECIPHER duomenų bazėje, genotipo-fenotipo ryšio analizė. 7p22.1 mikroduplicacijai būdingi klinikiniai požymiai detalizuoti palyginus 5 pacientų su persidengiančiais chromosominiais pokyčiais fenotipo aprašymus ir fotografijas. Kritinė DNR sritis susiaurinta iki 7p22.1 srities, kurioje yra 9 genai, iš jų *ACTB* genas yra svarbiausias genas kandidatas kraniofacialinės raidos sutrikimui.

I pacientas

Šiame darbe atlikus 105 K vLGH tyrimą pacientei su INN ir dismorfjiniais požymiais, identifikuota 7p22.1 mikroduplicacija. Tyrimo metu pacientė buvo 14,5 metų amžiaus. Probandė gimusi iš II nekomplikuoto nėštumo ir gimdymo. Jos svoris gimus buvo 4200 g (75-90 ‰), ūgis 51 cm (20-25 ‰), Apgar 1/5 min. vertintas 9/10 balų. 10 mėn. amžiuje probandės galvos apimtis buvo 48 cm (75-90 ‰). Nuo kūdikystės

stebėtas psichomotorinės raidos atsilikimas, vėliau išryškėjo nestabili eisena, diagnozuotas vaikų cerebrinis paralyžius, spastinė diplegija. Dvejų metų sulaukusiai mergaitei įtarta hidrocefalija, gydyta acetazolamidu. 8 metų probandės intelektiniai gebėjimai buvo įvertinti pagal WISC-III^{lt} testą, nustatytas IQ = 64. Dešimties metų sulaukusi mergaitė hospitalizuota dėl eisenos ir koordinacijos sutrikimo, galvos skausmų. Neurologinio ištyrimo duomenimis, buvo padidėjęs raumenų tonusas ir sausgysliniai refleksai (D>K), teigiami Babinskio refleksai. Stebėta skoliozė, čiurnų sąnarių kontraktūros, nepakankami motoriniai įgūdžiai. Šios hospitalizacijos metu tirtas akių dugnas, patologijos nenustatyta. Galvos smegenų kompiuterinės tomografijos (KT) išvada – vidutinio laipsnio vidinė hidrocefalija. Elektroencefalogramoje – bendrasmegeninio pobūdžio difuziniai pakitimai, giluminių smegenų struktūrų dirginimas, dominuojantis kaktinėse, smilkinių, pakaušio srityse. Elektrokardiogramoje stebėti vegetodistonijai būdingi požymiai.

Medicininės dokumentacijos duomenimis, probandės ūgis ir svoris visuomet buvo ties aukštesne normos riba. Paskutinės gydytojo genetiko apžiūros metu (14,5 m.) jos ūgis buvo 172 cm (90 %), svoris 69,7 kg (90-97 %), galvos apimtis 58 cm (>97 %). Stebėtas hipersteninis kūno sudėjimas, centrinis nutukimas, veido asimetrija, vidurinės veido dalies hipoplazija, ausys paprastos sandaros, žemai prisitvirtinusios ir atlėpusios, įstriži žemyn vokų plyšiai, akių hipertelorizmas (atstumas tarp vidinių akių kampų – 4 cm, išorinių – 10 cm, atstumas tarp vyzdžių – 6,5 cm), trumpa nosis, atviros šnervės, didelio laipsnio mikroretrognatija, aukštas ir siauras gomurys, mikrostomija, siaura viršutinė lūpa, lūpos pseudonesuaugimas, dermatoglifikos pokyčiai delnuose, plaštakų pirštai smailėjantys, trumpas V-as pėdų pirštas, Achilo sausgyslių kontraktūros, skoliozė, plokščiapėdystė, strijos klubų, pilvo, sėdmenų srityse (4.4 pav.). Dažnas spontaninis kraujavimas iš nosies. Brendimas pagal Tanner atitiko B-4, PH-4 stadiją, menstruacijos nuo 14 metų. Tėvai apibūdino mergaitę kaip linksmą, mėgstančią bendrauti asmenybę.



D.



C.



B.



A.

4.4 pav. Pacientės fenotipiniai požymiai genetinės konsultacijos metu (14,5 m.): A. Sunki mikroretrognatija. B. Žemai prisitvirtinusios, atlėpusios ausys, įstriži žemyn vokų plyšiai, akių hipertelorizmas, vidurinės veido dalies hipoplazija, veido asimetrija, trumpa nosis, atviros šnervės, mikrostomija, plonos lūpos, lūpos vidurio linijos pseudonesuaugimas. C. Trumpi V-i pirštai. D. Smailėjantys pirštai.

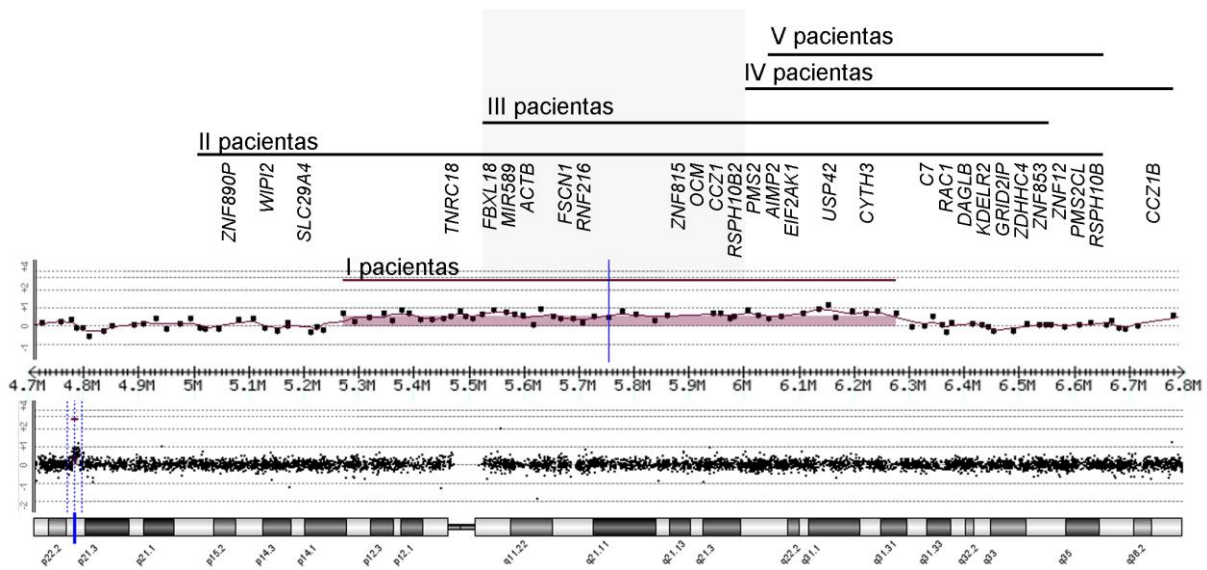
4.4 lentelė. I pacientei nustatytoje 7p22.1 duplikacijoje esantys genai, įtraukti į OMIM duomenų bazę.

Genas	Apibūdinimas
<i>FBL18</i>	F-rėmelio baltymo šeimos nariams, taip pat ir <i>FBL18</i> genui, būdingas vidutiniškai 40 aminorūgščių F-rėmelio motyvas. Šios šeimos nariai sąveikauja su SKP1 per F-rėmelį, taip pat ir su kitų baltymų sąveikos domenais, veikdami kaip ligazės (78).
<i>ACTB</i>	B-aktino (citoplazminio aktinto) mikrofilamentai, sąveikaudami su fosfolipaze D, reguliuoja ląstelių proliferaciją, pūslelių judėjimą ir sekreciją. B-aktinas svarbus ląstelių migracijai ir diferencijacijai embriogenezės laikotarpiu (79).
<i>FSCN1</i>	Dalyvauja aktino filamentų surišimo procesuose. Geno raiška vyksta dendritinėse ląstelėse ir limfinių mazgų T-ląstelių zonose (80).
<i>RNF216</i>	Šios šeimos baltymai sąveikauja su įvairiais baltymais. Sustiprina baltymo RIP indukuojamą apoptozę. Didžiausia šio geno raiška – periferinio kraujo leukocituose ir sėklidėse (81).
<i>OCM</i>	Šio geno koduojamas baltymas onkomodulinas – kalcio jonus surišantis baltymas. Priklauso kalmodulino baltymų šeimai (82).
<i>PMS2</i>	Geno produktas svarbus DNR klaidų taisymui ir apoptozės procesui dėl DNR pažeidimo (83). Geno mutacijos siejamos su kolorektaliniu vėžiu (84).
<i>AIMP2</i>	Šio geno produktas, tRNR sintetazės kofaktorius p38, stabilizuoja multi-tRNR sintetazės kompleksą (85). Corti ir kitų duomenimis (86), <i>AIMP2</i> geno koduojamas baltymas reikšmingas Parkinsono ligos patogenezėje.
<i>EIF2AK1</i>	Geno produktas, translacijos iniciacijos faktorius, slopina baltymų sintezę pakitus sąlygoms ląstelėje (87).
<i>CYTH3</i>	Geno produktas, citohesinas 3, svarbus ADP-ribozilinimo faktorių (ARFS) guanino nukleotido pakeitimui. ARFS yra Ras superšeimos narys, reguliuojantis pūslelių judėjimą eukariotų ląstelėse. Citohesinas 3 siejamas su polipeptidų pūslelių transportu Goldžio aparate. Per didelė šio geno raiška indukuoja Goldžio aparato morfologinius pokyčius (88).

Atlikus kariotipo tyrimą iš periferinio kraujo limfocitų, nustatytas normalus kariotipas, 46,XX. Molekulinio kariotipavimo tyrimu (vLGH, 105K) aptikta 979,8 kb dydžio 7p22.1 mikroduplikacija (arr 7p22.1 (5,337,072-6,316,915)x3 dn, hg18), kuri patvirtinta ir *de novo* kilmė (tiriant tėvus) nustatyta RL-PGR metodu. Duplikacija apima 15 genų (4.4 lent.): *TNRC18*, *FBXL18*, *MIR589*, *ACTB*, *FSCN1*, *RNF216*, *ZNF815*, *OCM*, *CCZ1*, *RSPH10B2*, *PMS2*, *AIMP2*, *EIF2AK1*, *USP42*, *CYTH3*. Du iš jų - *ACTB* ir *PMS2* - OMIM duomenų bazėje yra su liga siejami genai. Be jų, OMIM duomenų bazėje anotuoti kiti 7 duplikacijoje esantys genai: *FBXL18*, *FSCN1*, *RNF216*, *OCM*, *AIMP2*, *EIF2AK1*, *CYTH3* (4.5 pav.).

II pacientas (literatūros duomenys)

Chui ir kiti aprašė pacientą su 7p22.1 mikroduplikacija (69). Probandas buvo 28 mėn. amžiaus berniukas, konsultuotas gydytojo genetiko dėl kalbos raidos atsilikimo, postnatalinės makrocefalijos, neįprastų veido bruožų ir didelio priekinio momenėlio. Tai buvo pirmas vaikas sveikų tėvų šeimoje, gimęs iš nekomplikuoto nėštumo, 40 gest. savaitę. Gimus svoris 3315 g (25 ‰), ūgis 49 cm (25 ‰), galvos apimtis 34,3 cm (10-25 ‰). Motorinė berniuko raida atitiko amžiaus normas, vėlavo kalbos raida. Galvos smegenų ultragarsiniu tyrimu patologijos nenustatyta. Konsultuotas gydytojo endokrinologo, atmesta skydliaukės patologija ir įvertintas kaulinis – būdamas 24-ių mėn., jis atitiko 16 mėn. Genetinės konsultacijos metu, 28 mėn. amžiuje, probando galvos apimtis buvo ties 95 ‰, ūgis ir svoris atitiko 25-ą ir 50-ą ‰. Stebėtas atviras priekinis momenėlis, iškili kakta, plokščia ir plati nosies nugarėlė, atviros nosies šnervės, akių hipertelorizmas, žemai prisitvirtinusios ir rotuotos atgal ausys, preaurikulinė duobutė kairėje, platūs tarpai tarp dantų, nedidelio laipsnio kifoze, delnų dermatoglifikos pokyčiai, platūs nykščiai, nenusileidusios sėklidės. 36 mėn. vaikui atliktas širdies ultragarsinis tyrimas, nustatyta maža atvira ovalioji anga ir hemodinamiškai nereikšmingas antrinis prieširdžių pertvaros defektas. Atliktas audiologinis tyrimas, patologijos nenustatyta. Galvos smegenų KT išvada – priekinio momenėlio asimetrija, hidrocefalijos požymių nėra.



4.5 pav. 7 chromosomos ideograma ir tirtos pacientės vLGH tyrimo rezultatai. Viršutinėje paveikslo dalyje pateikti persidengiantys pokyčiai, identifikuoti kitiems pacientams (literatūros ir duomenų bazės DECIPHER duomenimis).

Citogenetiniu kariotipo tyrimu identifikuotas normalus kariotipas, 46,XY. Subtelomere FISH analize patologijos nenustatyta. Viso genomo vLGH aptikta nauja intersticinė duplikacija, arr7p22.1(5,092,748-6,797,449)x3 (hg18), 1,7 Mb dydžio. Duplikacija patvirtinta FISH tyrimu. Tiriant tėvus, nustatyta duplikacijos *de novo* kilmė. Pokytis apima 28 genus: *ZNF890P*, *WIP12*, *SLC29A4*, *TNRC18*, *FBXL18*, *MIR589*, *ACTB*, *FSCN1*, *RNF216*, *ZNF815*, *OCM*, *CCZ1*, *RSPH10B2*, *PMS2*, *AIMP2*, *EIF2AK1*, *USP42*, *CYTH3*, *C7*, *RAC1*, *DAGLB*, *KDEL2*, *GRID2IP*, *ZDHHC4*, *ZNF853*, *ZNF12*, *PMS2CL*, *RSPH10B* (4.5 pav.).

III pacientas (DECIPHER Nr. 266923)

Genealogijos duomenimis, paciento giminaitis iš tėvo pusės sirgo *Alzheimer* liga, kitam giminaičiui iš motinos pusės diagnozuota šizofrenija. Probando motinai nėštumo metu pasireiškė psichiatrinės problemos (nepatikslintos), gydyta neuroleptikais. Sulaukus 4 mėn., probandui diagnozuotas ūminis bronchiolitas, kuris komplikavosi sunkiu kvėpavimo nepakankamumu, metaboline acidoze ir koma, trukusia 4 dienas. Tuo metu nustatyta praeinanti distalinė tubulinė acidozė, persistavusi iki 3 metų. Sulaukus 6 metų, apžiūros metu stebėta INN (intelektiniai gebėjimai atitiko 38 mėnesių vaiko) ir autistinis elgesys, centrinis nutukimas, frontalinė angioma, hipertelorizmas, vokų plyšiai trumpi, įstriži žemyn, hipertelorizmas, ausys atlėpusios, žemai prisitvirtinusios, tarpai tarp dantų, retrognatija, mikrognatija, nusmailėjantys plaštakų pirštai, pėdų nykščiai nevienodo dydžio, bambinė išvarža. Galvos smegenų magnetinio rezonanso tomografijos (MRT) tyrimu struktūrinių pokyčių neaptikta. Atlikus tyrimus dėl paveldimųjų medžiagų apykaitos ligų, patologijos nenustatyta. *FMRI* geno tyrimu atmestas lūžiosios X chromosomos sindromo įtarimas.

Molekulinio kariotipavimo tyrimu nustatyta 1,18 Mb dydžio duplikacija, arr7p22.1(5,475,440-6,659,432)x3 dn (hg19), apimanti 21 geną: *FBXL18*, *MIR589*, *ACTB*, *FSCN1*, *RNF216*, *ZNF815*, *OCM*, *CCZ1*, *RSPH10B2*, *PMS2*, *AIMP2*, *EIF2AK1*, *USP42*, *CYTH3*, *C7*, *RAC1*, *DAGLB*, *KDEL2*, *GRID2IP*, *ZDHHC4*, *ZNF853* (4.5 pav.). Duplikacija patvirtinta nepriklausomu metodu. Ištyrus tėvus, nustatyta, kad jos kilmė – *de novo*.

IV pacientas (DECIPHER Nr. 262563)

Probandas gimė hipotrofiškas (ūgis <3 ‰), nustatytas skilvelių pertvaros defektas. Kūdikystėje pasireiškė maitinimo problemos, prastas svorio augimas, mikrocefalija. Buvo taikytas enterinis maitinimas. Nustatytas psichomotorinės raidos atsilikimas, autistinis elgesys ir stereotipiniai judesiai. Dvejų metų amžiaus vaikui stebėti dismorfiniai požymiai: epikantas, akių hipertelorizmas, nežymiai suaugę antakiai, žvairumas, ilgas ir plokščias filtrs, ilgi vokų plyšiai, plonos lūpos, skersinė raukšlė viename delne. Galvos smegenų struktūrinių anomalijų vaizduojamaisiais tyrimais nenustatyta.

Molekuliniu kariotipavimu nustatyta 7p22.1 duplikacija, arr7p22.1(6,036,431-6,870,943)x3 (hg19), 0,83 Mb dydžio. Pokytis paveldėtas iš tėvo, kuriam stebimas panašus fenotipas. Duplikacija apima 16 genų: *PMS2*, *AIMP2*, *EIF2AK1*, *USP42*, *CYTH3*, *C7*, *RAC1*, *DAGLB*, *KDELR2*, *GRID2IP*, *ZDHHC4*, *ZNF853*, *ZNF12*, *PMS2CL*, *RSPH10B*, *CCZ1B* (4.5 pav.).

V pacientas (DECIPHER Nr. 254379)

2 metų 9 mėn. vyriškos lyties pacientas, konsultuotas gydytojo genetiko. Įvertinus psichomotorinę raidą, nustatyta, kad ji atitinka 18 mėn. amžiaus vaiko raidą. Paciento ūgis atitiko -0,89 standartinio nuokrypio (SD), svoris 0,6 SD, KMI 1,5 SD, galvos apimtis -0,5 SD. Žymesnių dismorfinių požymių nebuvo stebėta. Elektroencefalogramoje pataloginių pokyčių nenustatyta.

Kariotipo tyrimu nustatytas normalus vyro kariotipas, 46,XY. Molekuliniu kariotipavimu aptikta 0,75 Mb dydžio mikroduplikacija arr7p22.1(6,026,434-6,777,442)x3 (hg19), kuri patvirtinta nepriklausomu metodu ir nustatyta *de novo* kilmė. Mikroduplikacija apima 14 genų: *AIMP2*, *EIF2AK1*, *USP42*, *CYTH3*, *C7*, *RAC1*, *DAGLB*, *KDELR2*, *GRID2IP*, *ZDHHC4*, *ZNF853*, *ZNF12*, *PMS2CL*, *RSPH10B* (4.5 pav.).

Rezultatų aptarimas

Didelės skiriamosios gebos molekulinio kariotipavimo technologijų naudojimas pacientams, turintiems INN ir/ ar įgimtas anomalijas, ištirti, suteikė galimybę nustatyti naujus mikrodelecinius/ mikroduplikacinius sindromus ir identifikuoti dozei jautrius

genus, susijusius su įvairiomis genetinėmis būklėmis. Tačiau šis diagnostinis įrankis yra gana naujas, o būklės, kurias lemia specifiniai patogeniniai kopijų skaičiaus pokyčiai, yra labai retos – tai apsunkina molekulinio kariotipavimo rezultatų interpretavimą (48). Aprašyta daug pacientų su patogeniniais kopijų skaičiaus pokyčiais, kurie nustatyti tik keliems asmenims. Tokiais atvejais labai sudėtingas chromosominio pokyčio klinikinės reikšmės, penetrantiškumo vertinimas ir paciento sveikatos priežiūros plano sudarymas (89).

7p22.1 mikroduplikaciją pirmą kartą aprašė Chui ir kiti 2011 m. (69). Minėto atvejo klinikiniai ir molekuliniai duomenys detalizuoti II paciento aprašyme. Šio darbo metu nustatyta persidengianti, tačiau mažesnė duplikacija (I pacientė), lėmusi panašius klinikinius požymius. Kritinę šiai būklei sritį apibrėžė ir susiaurino III, IV ir V pacientams nustatyti chromosominiai pokyčiai. Pastarųjų atvejų klinikiniai ir molekuliniai duomenys gauti bendradarbiaujant su DECIPHER duomenų bazės atstovais. Naujų pacientų su persidengiančiomis duplikacijomis ir panašiais klinikiniais požymiais identifikavimas patvirtina chromosominio pokyčio patogeninį pobūdį ir padeda nustatyti naujus sindromus (48).

Pastebima, kad genominių mikroduplikacijų klinikinės pasekmės dažnai yra lengvesnės nei tos pačios srities mikrodelecijų dėl nepilnos penetracijos ir/ ar nepastovios raiškos, todėl daugelio mikroduplikacinių sindromų klinikinių požymių pasireiškimas dažnai neatpažįstamas (89). Tačiau literatūros apžvalgų duomenimis, 7 chromosomos trumpojo peties dalinėms duplikacijoms būdingos specifinės įgimtos anomalijos (90-93). Iki šiol aprašyta daugiau nei 60 citogenetiškai aptiktų 7p duplikacijų, besiskiriančių savo dydžiu ir pozicija, daugelis iš jų – sudėtingi persitvarkymai, kurių priežastis – tėvų subalansuotos translokacijos arba inversijos (90, 93). Papadopoulou (92) apžvelgė 16 atvejų, kai 7p duplikacijos buvo vieninteliai chromosominiai pokyčiai. Pastebėta, kad dažniausi šiems pacientams pasireiškiantys klinikiniai požymiai – INN, hipotonija, kraniofacialinis dismorfizmas (didelis priekinis momenėlis, aukšta arba plati kakta, akių hipertelorizmas, įstriži žemyn vokų plyšiai, žemai prisitvirtinusios ir/ ar dismorfiškos ausys, gomurio anomalijos, mikrogenija ir/ ar retrogenija), delnų dermatoglifikos pokyčiai, skeleto ir kardiovaskulinės anomalijos. Citogenetinių duomenų analizė atskleidė, kad

kraniofacialiniam dismorfizmui galimai reikšminga 7p21 sritis (90, 94). Skeleto ir galūnių raidos sutrikimai tikėtina, taip pat susiję su distaline 7 chromosomos trumpojo peties dalimi (92). Tačiau visos šios aprašytos duplikacijos buvo matomos standartiniais citogenetiniais metodais, todėl per didelės tiksliai genotipo-fenotipo ryšio analizei.

Chui ir kitų (69) aprašyta 7p intersticinė duplikacija buvo pirmoji, charakterizuota molekulinio kariotipavimo tyrimu. Šio 28 mėn. amžiaus paciento (II) ir mūsų tiriamosios (I) klinikiniai požymiai buvo panašūs – abiem stebėtas kalbos raidos atsilikimas, makrocefalija, akių hipertelorizmas, atviros šnervės, žemai prisitvirtinusios ausys ir skeleto anomalijos. Makrocefalija anksčiau nebuvo aprašyta pacientams su 7p duplikacijomis. Tikėtina, kad didesnės apimties duplikacijose yra daugiau genų, sutrikdančių smegenų raidos procesus. Mūsų pacientei makrocefalija ir neurologinė simptomatika (spastiškumas ir eisenos sutrikimas) galėjo būti hidrocefalijos pasekmė. Sunkūs kraniofacialiniai dismorfiniai požymiai, tokie, kaip mikroretrognatija, aukštas ir siauras gomurys, mikrostomija, būdingi mūsų pacientei, nepasireiškė II pacientui, tačiau dažnai stebėti kitiems asmenims su citogenetiškai matomomis 7p duplikacijomis. I pacientei būdingi nusmailėjantys pirštai, aukštas ūgis, centrinis nutukimas – asmenims su 7p duplikacija iki šiol neaprašyti požymiai. Galimas paaiškinimas – duplikacijos srityje esančių genų penetracijos bei raiškos variavimas. Kita vertus, atsižvelgiant į besikeičiantį su laiku I pacientės fenotipą, negalima atmesti, kad su 7p duplikacija susiję klinikiniai požymiai nepakankamai įvertinti, nes kai kurie jų išryškėja su amžiumi. Tai patvirtina ir III paciento fenotipo aprašymas – be charakteringų 7p duplikacijai veido dismorfinių požymių, jam stebėtas centrinis nutukimas ir skeleto anomalijos. Šiam pacientui būdingi nusmailėjantys plaštakų pirštai ir trumpi, nevienodo ilgio kojų nykščiai patvirtina neatsitiktinį šių požymių pasireiškimą mūsų tiriamajai.

Papadopoulou ir kiti (92) pasiūlė, kad klinikiniai požymiai, esant 7p duplikacijai, yra susiję su keliais skeleto ir galūnių raidai svarbiais genais/ sritimis distalinėje 7p dalyje: *GLI3* (OMIM 165240; 7p13), *HOXA13* (OMIM 142959; 7p15-7p14.2), *TWIST* (OMIM 601622; 7p21), *CRSI* (OMIM 123100; 7p21.3-7p21.2) ir *MEOX2* (OMIM 600535; 7p22.1-7p21.3). Šios sritys taip pat aptartos kitose

publikacijose (69, 91, 93, 95, 96), tačiau nė vieno iš minėtų genų nėra šio skyriaus rezultatuose aprašytų keturių pacientų chromosominių pokyčių srityse. I pacientei nustatyta duplikacija pilnai persidengia su 7p22.1 mikroduplikacija, aprašyta Chui ir kitų (II pacientas), sumažindama kritinę regioną šiam atpažįstamam fenotipui iki 0,98 Mb srities, kurioje yra 15 genų. III paciento fenotipiniai požymiai labai panašūs į mūsų tiriamosios, įskaitant veido dismorfizmą, skeleto anomalijas ir kūno sudėjimą. Šio paciento chromosominis pokytis didžiąja dalimi persidengia su I pacientės kopijų skaičiaus pakitimu ir dar labiau susiaurina kritinę sritį, ekskliuduodamas *TNRC18* geną iš kandidatinių šiai būklei genų sąrašo. Ketvirtajam pacientui taip pat būdingas hipertelorizmas, tačiau nėra mikrogenijos, sąkandžio problemų ir skeleto anomalijų, ir priešingai, nei mūsų tiriamajai, pasireiškė mikrocefalija. Dydžiu ir lokalizacija artimas IV paciento mikroduplikacijai chromosominis pokytis nustatytas V pacientui, kuriam nebuvo stebėta reikšmingų dismorfinių požymių ar skeleto anomalijų. Šis pastebėjimas leidžia manyti, kad distaliau *RSPH10B2* esantys genų dozės perteklius gali būti nesusijęs su kraniofacialinės srities ir skeleto anomalijomis. Būtinai tolesnis IV ir V pacientų stebėjimas, kadangi šie klinikiniai požymiai gali išryškėti su amžiumi. Vis dėl to šiuo metu daugiausia duomenų, kad kraniofacialiniam dismorfizmui ir skeleto anomalijoms gali būti reikšminga sritis apima 9 genus: *FBXL18*, *MIR589*, *ACTB*, *FSCN1*, *RNF216*, *ZNF815*, *OCM*, *CCZ1*, *RSPH10B2*, iš kurių 5 yra įtraukti į OMIM duomenų bazę (*FBXL18*, *ACTB*, *FSCN1*, *RNF216*, *OCM*). Nė vienas iš šių genų anksčiau nebuvo minimas kaip 7p duplikacijų lemiamo fenotipo kandidatinis genas. Tačiau šiame kontekste dėmesys krypta į *ACTB* (OMIM 102630) geną, koduojantį β-aktiną, esminį citoskeleto komponentą, kuris svarbus ląstelių migracijai (97). Transgeninėms pelėms, nulinėms pagal β-aktino geną (*Actb*^{-/-}), būdinga letali būklė anksti embrioniniu laikotarpiu, o tai rodo, kad β-aktinas yra reikšmingas raidai embrioniniu laikotarpiu (97). Per didelę β-aktino raiška lemia ląstelių membranų pokyčius ląstelių migravimo metu (98). Galvos morfogenezė yra sudėtingas procesas, kuriame dalyvauja visi trys germinaciniai lapeliai ir taisyklinga raida priklauso nuo tikslių šių struktūrų ir jų darinių sąveikų erdvės ir laiko atžvilgiu (99). Todėl ląstelių judėjimas yra daugeliui kraniofacialinio proceso stadijų kritinis procesas.

Taigi atlikta penkių pacientų klinikinių ir molekulinį duomenų analizė, iš kurių viena buvo mūsų tiriamoji, vienas – aprašytas literatūroje, kitų trijų informacija gauta efektyviai bendradarbiaujant su DECIPHER duomenų bazės atstovais. Tikėtina, kad 7p22.1 duplikacija lemia raidos atsilikimą, kliniškai atpažįstamą kraniofacialinį dismorfizmą ir skeleto anomalijas. Kraniofacialiniai požymiai, kaip akių hipertelorizmas, įstriži žemyn vokų plyšiai, žemai prisitvirtinusios ir dismorfiškos ausys, aukštas gomurys, mikrogenija, anksčiau buvo aprašyti pacientams su citogenetiškai nustatytais 7p duplikacijomis. Mūsų duomenys rodo, kad 7p22.1 sritis, apimanti 9 genus (*FBXL18*, *MIR589*, *ACTB*, *FSCN1*, *RNF216*, *ZNF815*, *OCM*, *CCZ1*, *RSPH10B2*), gali būti kritinė šių klinikinių požymių pasireiškimui. 7p22.1 mikroduplikacijos klinikinės pasekmės gali būti dėl šioje srityje esančių genų per didelės dozės efekto. Kraniofacialinės raidos sutrikimui stiprus kandidatinis genas yra *ACTB* genas. Aprašytų pacientų tolesni tyrimai ir naujų pacientų su persidengiančiais chromosominiais pokyčiais klinikinių duomenų analizė gali būti svarbi naujam 7p22.1 mikrodeleciniam sindromui nustatyti.

4.3.2 Klinikinis ir molekulinis 17q21.33 mikrodelecijos apibūdinimas

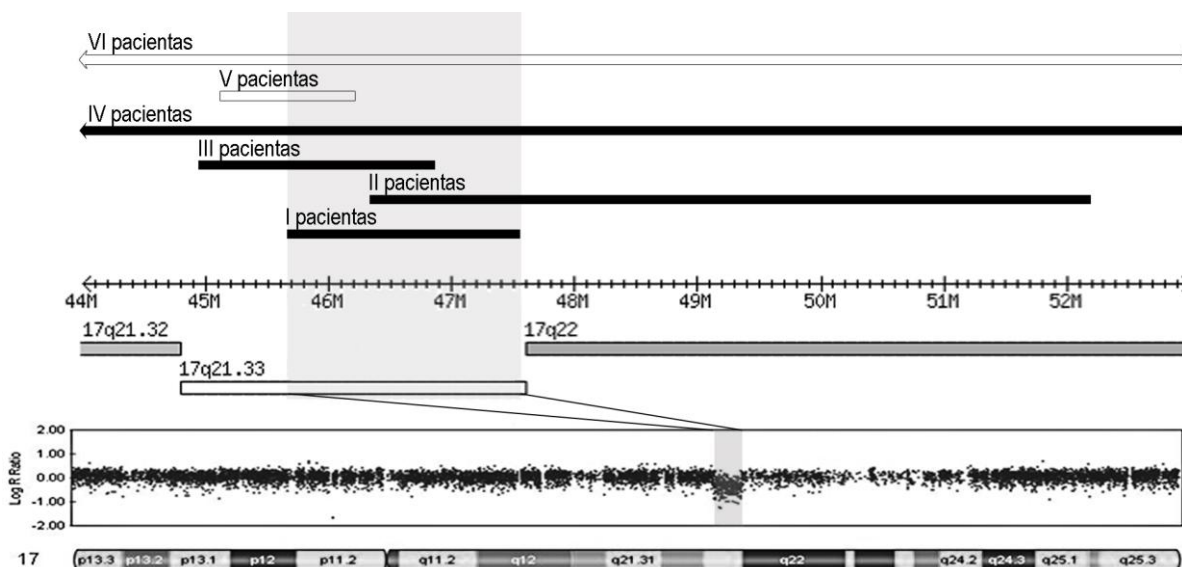
Vienam iš tiriamųjų pacientų nustatyta 17 chromosomos ilgojo peties mikrodelecija, iki šiol neaprašyta mokslinėje literatūroje. Delecija atitiko visus patogeniškumo kriterijus ir buvo susieta su tiriamojo klinikiniais požymiais. Pacientų su panašiais chromosominiais pokyčiais paieškai naudoti ir kiti tarptautiniai šaltiniai – DECIPHER ir ECARUCA duomenų bazės, atlikta genotipo-fenotipo ryšio analizė.

I pacientas

Šio mokslinio tyrimo metu 17 metų amžiaus pacientui nustatyta 1,8 Mb dydžio 17q21.33 srities mikrodelecija. Probandas buvo pirmasis vaikas, gimęs sveikiems tėvams (vaiko gimimo metu motina buvo 29 metų, tėvas - 25 metų). Genealogijos duomenimis, probandas turėjo vyresnį sveiką brolių iš mamos pusės. Probandas gimė iš normalaus nėštumo ir nekomplikuoto gimdymo, 39 gest. savaitę. Jo svoris gimus buvo 2550 g (<3 ‰), ūgis 51 cm (25 ‰). Motorinė raida buvo normali, tačiau stebėtas kalbinės raidos vėlavimas. Nuo kūdikystės pasireiškė ūgio ir svorio augimo atsilikimas. 10 metų berniukas buvo konsultuotas gydytojo vaikų endokrinologo dėl žemo ūgio. Atliktos riešų rentgenogramos, nustatyta, kad kaulinis amžius atitinka chronologinį amžių. 14 metų amžiuje probando ūgis buvo 141 cm (3 ‰), svoris 27 kg (<3 ‰), galvos apimtis 49 cm (<3 ‰). Pacientui būdavo dažnos kvėpavimo takų infekcinės ligos, pasireiškė miego sutrikimai – sunkiai užmigdavo, naktinis miegas buvo negilus, dažnai prabusdavo. Su amžiumi išryškėjo elgesio problemos – dažnesni pykčio protrūkiai, susierzinimas. Genetinės konsultacijos metu, sulaukus 17 metų, paciento ūgis ir svoris atitiko amžiaus normas (atitinkamai, 171 cm, 10-25 ‰ ir 51 kg, 3 ‰), tačiau išliko mikrocefalija (52 cm, <3 ‰). Kiti stebėti požymiai: brachicefalija, ilgas veidas, iškili nosies nugarėlė, stora apatinė lūpa, mikrogenija, netaisyklingas sąkandis (4.6 pav.), plaštakų V-ą pirštų klinodaktilija, platus tarpas tarp I-II pėdų pirštų. Paciento lytinis brendimas atitiko amžiaus normas. Konsultuotas gydytojo vaikų oftalmologo, nustatyta miopija. Psichologinis vertinimas atliktas, kai vaikui suėjo 16 metų: nustatytas bendras IQ=65, verbalinis IQ=68, neverbalinis IQ=63 (WISK-III).



4.6 pav. Paciento veido priekinis ir šoninis vaizdas. Stebimi fenotipiniai požymiai: ilgas veidas, stora apatinė lūpa (A), nosis didelė, iškilia nugarėle, mikrogenija (B).



4.7 pav. Apatinėje dalyje – 1,8 Mb delecija, 17q21.33 srityje, tarp 45,682,246 bp ir 47,544,816 bp (hg18), nustatyta naudojant Infinium HD viso genomo gentotipavimo technologijas (HumanCytoSNP-12 BeadChip, Illumina Inc., JAV). Aukščiau – mūsų tiriamajam (I pacientas) ir kitiems pacientams (įtrauktiems į DECIPHER ir ECARUCA duomenų bazes) nustatytų delecijų schematinis vaizdas.

Citogenetiniu tyrimu iš periferinio kraujo limfocitų kultūros nustatytas normalus kariotipas, 46,XY. Tyrimas dėl submikroskopinių pokyčių atliktas naudojant Infinium HD viso genomo genotipavimo technologijas (HumanCytoSNP-12 BeadChip, Illumina Inc., JAV). Nustatyta 17q21.33 mikrodelecija, 1,8 Mb dydžio, kuri patvirtinta FISH metodu (4.7 pav.). Šiuo metodu taip pat buvo tirti tėvai, nustatyta mikrodelecijos kilmė – *de novo*. Chromosominis pokytis apėmė 24 genus, iš jų 21 – baltymus koduojantis genas, 3 – RNR genai.

II pacientas (DECIPHER Nr. 878)

Į DECIPHER duomenų bazę įtrauktas pacientas (Nr. 878), kuriam nustatyta 17q21.33q22 srities mikrodelecija. 4 m. 10 mėn. stebėti šie jo klinikiniai požymiai: normalus ūgis ir santykinai mažas svoris (atitinkamai 75 ir 25 ‰), maža galvos apimtis (3 ‰), brachicefalija, mikrogenija, 1x1 cm apimties įgimta odos aplazija galvos plaukuotoje dalyje, apvalus veidas, didelės, minkštos ausys, dalinė odinė II-III koku pirštų sidanktilija, nykščio lenkimo raukšlių anomalijos. Atlikus molekulinį kariotipavimą, identifikuota mikrodelecija arr17q21.33q22(48,965,790-54,817,786)x1 (hg19), 5,8 Mb dydžio (4.7 pav.). Delecijos kilmė nenustatyta.

III pacientė (DECIPHER Nr. 255632)

Persidengianti delecija nustatyta pacientei, DECIPHER duomenų bazėje užkoduotai 255632 numeriu. Pagrindiniai klinikiniai požymiai, nurodyti klinikiniam pacientės aprašyme: INN, veido dismorfiniai požymiai (nepatikslinka), stemplės atrezija/stenozė. Į užklausimą dėl detalesnės klinikinės informacijos atsako negauta. Citogenetine analize probandei nustatytas normalus kariotipas, 46,XX. Molekuliniu kariotipavimu apitkta 1,92 Mb dydžio submikroskopinė delecija arr17q21.33(47,554,863-49,471,989)x1, kurios kilmė – *de novo*.

IV pacientas (ECARUCA)

ECARUCA duomenų bazėje aprašyti paciento su 17q21.3q23 delecija klinikiniai ypatumai. Probandas gimė mažo svorio, buvo žemo ūgio, nustatyta INN. Kiti fenotipiniai požymiai: brachicefalija, plagiocefalija, mikrocefalija, apvalus veidas, hipertelorizmas, trumpi ir įstriži aukštyn vokų plyšiai, mikrogenija, nuleisti žemyn

lūpų kampai, ilgas filtras, nesuaugęs liežuvėlis, tracheozofaginė fistulė, šleivapėdystė, pirštų sinostozė, nykščio anomali padėtis. Tiksliai delecijos genomine pozicija ir dydis nebuvo nurodyti.

Rezultatų aptarimas

Paciento, turinčio INN ir dismorfinių požymių, molekulinio kariotipavimo tyrimu nustatyta 17q21.33 mikrodelecija. Rezultatų analizės metu literatūroje nebuvo aprašyta atvejų su persidengiančiais patogeniniais kopijų skaičiaus pokyčiais. Tolesnės pacientų paieškos tarptautinėse duomenų bazėse dėka aptikti trys asmenys su persidengiančiomis mikrodelecijomis. Literatūroje aprašyti du pacientai su 17q21.33 srities duplikacijomis (100, 101). Tai rodo, kad šioje genais gausioje srityje yra centrinės nervų sistemos raidai ir funkcionavimui svarbių ir dozei jautrių genų.

DECIPHER duomenų bazėje aprašytam pacientui (Nr. 878) su 5,8 Mb dydžio 17q21.33q22 delecija, būdingi keli klinikiniai požymiai, kurie pasireiškė ir mūsų tiriamajam, tai INN, nepakankamas svorio augimas, maža galvos apimtis, brachicefalija, mikrogenija. Nors šiam pacientui nustatyta delecija yra kelis kartus didesnė už deleciją I pacientui, ji suteikia naudingos informacijos apie būklės, susijusias su 17q21.33 srities delecijomis, o bendrų klinikinių požymių nustatymas suteikia tikrumo dėl chromosominio pokyčio, aptikto mūsų tiriamajam, patogeninės prigimties.

III pacientui nustatyta 1,92 Mb dydžio delecija, persidengianti su 2/3 mūsų pacientui aptikto chromosominio pokyčio. Nors abiem pacientams diagnozuota INN ir dismorfiniai veido bruožai, pastarieji III pacientui nebuvo detalizuoti, tai apsunkino 17q21.33 mikrodelecijai būdingų klinikinių požymių nustatymą. III pacientui taip pat buvo diagnozuota stemplės atrezija/ stenozė, nepasireiškusi mūsų tiriamajam.

Vienas iš daugelio klinikinių požymių, stebėtų IV pacientui, kuriam nustatyta 17q21.3q23 delecija, taip pat buvo tracheozofaginė fistulė. Tikėtina, kad kritinė šiai įgimtai anomalijai sritis nėra mūsų tiriamajam nustatytos delecijos regione. Stebėti keli bendri IV ir I pacientų klinikiniai požymiai: mažas svoris gimus, žemas ūgis, mikrocefalija ir mažas apatinis žandikaulis. Tačiau IV paciento delecija aptikta

kariotipo tyrimu ir nebuvo charakterizuota molekulinio kariotipavimo metodu, todėl yra per didelė efektyviai genotipo-fenotipo ryšio analizei.

Mūsų tiriamajam nustatytos mikrodelecijos patogeniškumą rodo ir jos ribose esančių genų kiekis. Iš 24-ių genų, esančių delecijoje, septyniolikos genų raiška vyksta smegenyse: *CACNA1G*, *WFIKKN2*, *EME1*, *ANKRD40*, *LUC7L3*, *RSAD1*, *CA10*, *NME1-NME2*, *MRPL27*, *SPAG9*, *LRRC59*, *ACSF2*, *UTP18*, *TOB1*, *MYCBPAP*, *MBTD1* ir *EPN3*. Taigi šie genai yra kandidatai kognityvinių funkcijų sutrikimui, pasireiškusių mūsų tiriamajam. Tačiau turima duomenų tik apie kelių iš šių genų galimą jautrumą dozei. Vienas iš jų – *CACNA1G* genas, koduojantis nuo įtampos priklausančius kalcio kanalus, ir manoma, yra svarbus neuronų funkcionavimui ir nervinių impulsų perdavimui. Šio geno haplonepakankamumas gali sutrikdyti centrinės nervų sistemos raidos ir funkcionavimo procesus. Iki šiol nėra aptikta *CACNA1G* geno mutacijų žmonėms. Tačiau kelių studijų duomenimis, nustatyta šio geno asociacija su autizmu (102, 103) ir epilepsija (104). Šie tyrimai patvirtina, kad *CACNA1G* genas yra tinkamas INN kandidatinis genas. Kognityvinius sutrikimus mūsų pacientui gali lemti ir *CA10* geno haplonepakankamumas. Nustatyta ryški šio geno raiška žmogaus galvos smegenyse (smegenėlėse, frontalinėse smegenų žievės dalyse), sėklidėse, seilių liaukose ir inkstuose (105, 106). Manoma, kad šis genas svarbus CNS, ypač galvos smegenų, raidai.

Prenatalinio ir postnatalinio augimo atsilikimui gali būti svarbus *CHAD* geno haplonepakankamumas. Šio geno produktas, chondroadherinas, yra kremzlėse aptinkamas baltymas, pasižymintis ląstelių sujungimo savybėmis. Manoma, kad jis svarbus chondrocitų augimo ir proliferacijos reguliavimui (107). Tasheva ir kitų duomenimis, *Chad* raiška vyksta daugelyje audinių, įskaitant rageną, tinklainę, smegenėles, periferinius nervus, kraujagysles, kasą ir kiaušides (108).

Taigi iki šiol neaprašytos 17q21.33 mikrodelecijos, nustatytos pacientui, turinčiam INN ir dismorfinių požymių, klinikinių ir molekulinį duomenų analizė suteikia papildomų žinių apie galimus dozei jautrius, kandidatinius INN genus. *CAD10* ir *CACNA1G* genai yra susiję su galvos smegenų raida ir funkcionavimu, jų haplonepakankamumas gali lemti kognityvinius sutrikimus. Galimas kandidatinis genas prenataliniam ir postnataliniam augimo atsilikimui – *CHAD* genas, kurio

produktas chondroadherinas aptinkamas kremzlėse ir kituose audiniuose. 17q21.33 mikrolelecijos klinikiniam charakterizavimui bei *CAD10*, *CACNA1G* ir *CHAD* genų haplonepakankamumo įtakos fenotipui įvertinimui būtinas papildomų pacientų su persidengiančiomis mikrolelecijomis detalus klinikinis ištyrimas.

4.3.3 Klinikinis ir molekulinis 2q34 mikrodelecijos apibūdinimas

Didelės skiriamosios gebos molekulinio kariotipavimo technologijų naudojimas pacientams, turintiems INN, ištirti labai pagerino kliniškai reikšmingų kopijų skaičiaus pokyčių nustatymą visame genome. Šios technologijos taip pat pagreitino tiek gretutinių genų, tiek monogeninius sindromus lemiančių genų išaiškinimą. Pastaraisiais metais publikuoti tik vieną geną apimančių mažų chromosominių pokyčių nustatymo atvejai pacientams, turintiems INN, autizmą, šizofreniją ir kitus sutrikimus (42, 57). Tokie atvejai ypatingai reikšmingi tiksliai genotipo-fenotipo ryšio analizei. Šiame darbe chromosominiai pokyčiai, apimantys tik vieną geną, nustatyti trims pacientams. Tai 2q34, 4q28.3 ir 16q22.3 mikrodelecijos, atitinkamai 0,96 Mb, 1,53 Mb ir 0,73 Mb dydžio. Rezultatuose pateikiama 2q34 mikrodelecijos, nustatytos pacientui, turinčiam INN, klinikinė ir molekulinė analizė.

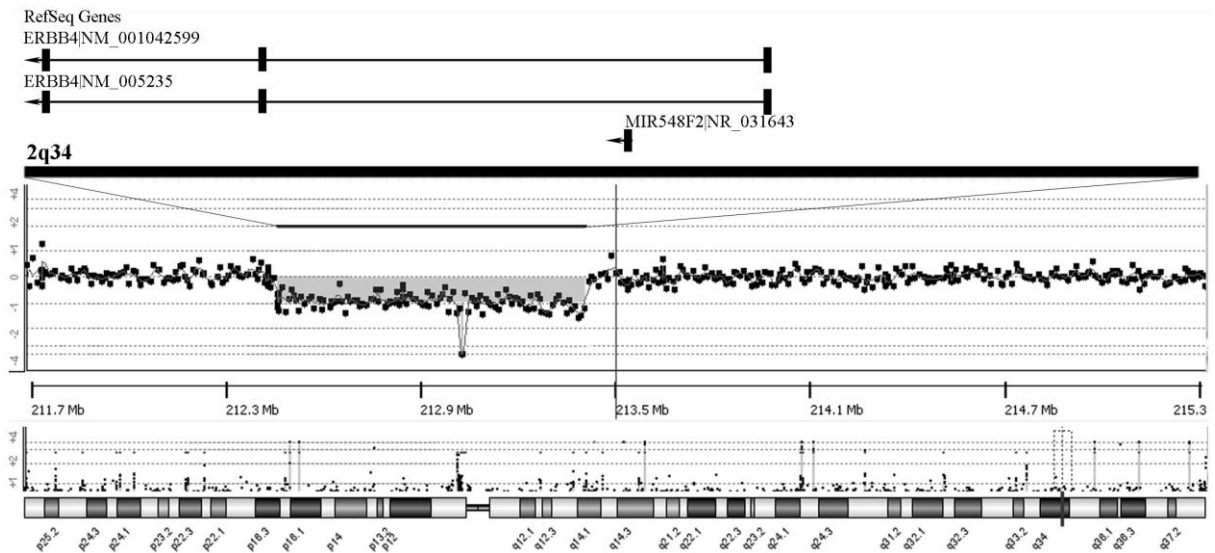
I pacientas

Mūsų tirtas 15 m. pacientas buvo pirmas vaikas, gimęs sveikiems tėvams. Gimė išnešiotas, be komplikacijų, 3750 g svorio (50 ‰), 51 cm ūgio (25-50 ‰). Motorinė raida buvo normali – pradėjo sėdėti nuo 8 mėn., vaikščioti savarankiškai nuo 12 mėn. amžiaus, tačiau kalbos raida vėlavo, 5 m. amžiuje tarė tik kelis garsažodžius. Vaikas buvo hiperaktyvus, 5 m. amžiuje diagnozuotas vidutinis protinis atsilikimas. Konsultuotas gydytojo genetiko, atliktas kariotipo tyrimas, chromosomų skaičiaus pokyčių ir stambių struktūrinių persitvarkymų nenustatyta (46,XY). Atlikus *FMRI* geno tyrimą, atmestas lūžiosios X sindromo įtarimas. Galvos smegenų KT tyrimu struktūrinių smegenų pokyčių nenustatyta.

Sulaukus 15 m., pakartotinai konsultuotas gydytojo genetiko, paciento ūgis buvo 184 cm (97 ‰), svoris 82 kg (97 ‰). Stebėti keli dismorfiniai požymiai: stori antakiai, suaugę medialiniais kraštais, akys giliai akiduobėse, apvalus nosies galiukas, storos lūpos, atlėpusios ausys (4.8 pav.), plaštakų V-o piršto klinodaktilija. Intelektinių gebėjimų vertinimo pagal WISC-III^{lt} atlikti nepavyko, psichomotorinė raida pagal Denverį labai sulėtėjusi: socialinis kontaktas – 5 m., smulkioji motorika – 4,5 m., kalba – 1 m. 3 mėn. – 1,5 m., stambioji motorika – 4 m. 9 mėn. amžių. Su



4.8 pav. I paciento veidas iš priekio (A) ir profiliu (B). Pagrindiniai fenotipiniai požymiai: platūs antakiai, akys giliai, apvalus nosies galiukas, atlėpusios ausys, storos lūpos.



4.9 pav. Antros chromosomos ideograma. vLGH rezultatai, $arr2q34(212505294-213463152) \times 1$, pavaizduoti apatinėje dalyje. Aukščiau – pokyčio srityje esantys genai.

amžiumi išryškėjo agresyvus elgesys ir dirglumas, komunikacijos įgūdžiai išliko ypatingai žemi. Atliktas vLGH 400 K tyrimas, nustatytas chromosominis pokytis arr2q34(212,505,294-213,463,152)x1, 0,96 Mb dydžio, kuris buvo patvirtintas RL-PGR metodu (4.9 pav.). Šiuo metodu tiriant tėvų DNR, nustatyta pokyčio kilmė – *de novo*. Delecijos sritis dalinai apėmė tik vieną geną, *ERBB4*. Centromerinis trūkio taškas buvo *ERBB4* geno trečio introno srityje, telomerinis trūkio taškas – tarpgeninėje srityje (tarp *MIR548F2* ir *MIR4776-2* genų).

II pacientas (literatūros duomenys)

2008 metais Walsh ir kiti (42) paskelbė molekulinis duomenis paciento, kuriam buvo diagnozuota šizofrenija. Molekulinio kariotipavimo tyrimu šiam tiriamajam buvo nustatyta 0,4 Mb delecija, nutraukianti *ERBB4* geną. Nustatyta, kad mutantinis alelis produkuoja pakitusį transkriptą, kuriame 1-19 *ERBB4* geno egzoni su jungti su už delecijos srityje likusio *ERBB4* geno ir tolesnio intergeninio genomino regiono esančia 198 bp DNR intergenine seka. Manoma, kad pakitęs transkriptas koduoja *ERBB4* baltymo 1-767 aminorūgščių seka, prie kurios galo jungiasi 15 kitų, *ERBB4* baltymui nebūdingų aminorūgščių seka. Tai lemia baltymo intraląstelinės kinazės domeno stoką. Tikėtina, kad numanomas mutantinis baltymas funkcionuoja panašiai kaip sukurtas dominantinis neigiamas *ERBB4* (DN-ErbB4) baltymas, kuris sukelia neuronų migracijos (109) ir sinaptinės neurotransmisijos defektus (110, 111).

III pacientė (literatūros duomenys)

Backx ir kiti (64) aprašė pacientę su giliu protiniu atslkimu ir ankstyva mioklonine encefalopatija, kuriai nustatyta *de novo* reciprokinė translokacija, pertraukianti *ERBB4* geną. Mergaitė buvo antras vaikas, gimęs sveikiems tėvams. Nėštumas buvo nekomplikuotas, gimė išnešiotą. 11 dieną po gimimo ji buvo hospitalizuota dėl silpno čiulpimo, tuomet diagnozuotas vienpusis policistinis inkstas ir 4 tipo tubulinė acidozė. Hospitalizacijos metu pirmą kartą pastebėti traukuliai, skirtas fenobarbitalis. Karščiavimo metu pacientei pasireiškė du generalizuotų toninių-kloninių traukulių priepuoliai. Pirmojoje EEG, atliktoje 15 dienų vaikui, patologių pokyčių nenustatyta. Tačiau po kelių savaičių EEG stebėti epileptiforminiai pakitimai. Nepaisant gydymo, traukuliai dažnėjo. Stebėtas sunkus psichomotorinės raidos

atsilikimas, sunki hipotonija, akių kontakto nebuvimas, riboti spontaniniai judesiai, progresuojanti mikrocefalija. Galvos smegenų MRT tyrimo išvada – vidutinė žievinė ir subžievinė atrofija. Pacientė pakartotinai konsultuota gydytojo genetiko sulaukus 4 m. 10 mėn., stebėtas sunkus raidos atsilikimas (atitinkantis 4 mėn. amžių), mikrocefalija, aksialinė hipotonija, periferinė hipertoniya. Išliko kasdieniniai miokloninio tipo priepuoliai.

Kariotipo tyrimu nustatyta *de novo* reciprokinė translokacija tarp 2 ir 6 chromosomų, t(2;6)(q33.1;p23). Atlikus didelės skiriamosios gebos molekulinio kariotipavimo tyrimą, patogeninių kopijų skaičiaus pokyčių nenustatyta. FISH tyrimu detalizuotas trūkio taškas antroje chromosomoje, nustatyta, kad jo lokalizacija – tarp *ERBB4* geno 1 ir 2 egzonų. Chromosominis trūkis 6 chromosomoje nutraukia *GMDS* geną. Sekvenavus *ERBB4* ir *GMDS* genus, mutacijų normaliuose aleliuose nenustatyta.

Rezultatų aptarimas

Mūsų darbe vienam iš tiriamųjų (I pacientas) nustatyta *de novo* 2q34 delecija, apimanti *ERBB4* geno 1-3 egzonus. Walsh ir kiti (42) anksčiau yra aprašę kitą *ERBB4* geno delecijos atvejį (II pacientas), tačiau šio chromosominio pokyčio pasekmės gali būti lengvesnės nei visiškai *ERBB4* geno haplonepakankamumas, kadangi delecija apima terminalinę *ERBB4* geno dalį ir dėl to negalima atmesti pakitusio transkripto poveikio fenotipui. Taip pat literatūroje (64) aprašyta pacientė su subalansuota reciprokine translokacija, pertraukiančia *ERBB4* geną ir *GMDS* geną, esantį 6-oje chromosomoje (III pacientė). Nors pastaruoju atveju autoriai pacientės klinikinius požymius sieja su *ERBB4* geno haplonepakankamumu, negalima atmesti ir *GMDS* geno nutraukimo poveikio fenotipui. Delecija mūsų tiriamajam apima proksimalinę *ERBB4* geno dalį, taigi neabejotinai lemia *ERBB4* geno haplonepakankamumą, pasireiškusį hiperaktyvumu, kognityvinių funkcijų, ypač kalbos, sutrikimu.

ERBB4 yra 1,16 Mb ilgio genas 2q34 chromosominėje srityje, koduojantis vieną iš keturių ERBB šeimos transmembraninių tirozino kinazių narių (112). Iš visų ERBB baltymų centrinės nervų sistemos raidos procesams svarbiausias ERBB4 baltymas. Pagrindiniai ERBB4 receptoriaus ligandai – neuroregulinai (NRG1-4),

priklausantys augimo veiksnių šeimai. *NRG1-ERBB4* signalinis kelias svarbus daugeliui neurobiologinių procesų: interneuronų susidarymui, jų migracijai ir diferenciacijai žievėje prenataliniu laikotarpiu bei neuronų signalų perdavimo procesams suaugusių žmonių smegenyse (113).

Steffanson ir kiti (114) pirmieji pateikė įrodymų, kad *NRG1* gali būti susijęs su šizofrenija Islandijos populiacijoje. Tačiau iki šiol nenustatyta *NRG1* geno koduojančių mutacijų. Sukurtos kelios transgeninių pelių linijos su *ErbB4* ir *NRG1* genų mutacijomis, padedantys nustatyti šių genų reikšmę smegenų raidai ir funkcionavimui. Neseniai Tan ir kitų (115) atlikto tyrimo duomenimis, *NRG1* arba *ErbB4* stoka gali padidinti polinkį epilepsijai. Savo darbe jie pateikia įrodymų, kad *NRG1-ErbB4* signaliniai keliai yra svarbus mechanizmas, inhibuojantis limbinę epileptogenezę. Nors mūsų pacientui traukuliai nepasireiškė, Backx ir kitų (64) pacientės klinikinis aprašymas patvirtina įtarimą, kad *Erb4* yra susijęs su epilepsija.

Taigi šiame darbe buvo nustatyta *de novo* 2q34 delecija, apimanti proksimalinę *ERBB4* geno dalį, pacientui, kuriam būdingi kognityviniai sutrikimai (ypatingai kalbinės raidos sutrikimu) ir hiperaktyvumas. Tai trečiasis *ERBB4* geno nutraukimo, tačiau pirmasis izoliuotas ir pilnas *ERBB4* geno haplonepakankamumo atvejis. Nors įvairūs *NRG1-ERBB4* sistemos VNP yra siejami su šizofrenija, *ERBB4* geno haplonepakankamumas gali lemti CNS raidos ir kognityvinės funkcijos sutrikimus.

Apibendrinant trečiojo uždavinio rezultatus, iš 29 pacientų, kuriems nustatytas patogeninis chromosominis pokytis, 45 % identifikuotas naujas kopijų skaičiaus pokytis. Ateityje gali išaiškėti, kad kai kurie iš pastarųjų chromosominių nesubalansuotumų yra pasikartojantys chromosominiai mikrodeleciniai sindromai. Todėl svarbu rinkti duomenis apie pacientus su patogeniniais chromosominiais pokyčiais bei juos skelbti mokslinėje literatūroje, detalizuojant pacientų fenotipinius požymius ir genominę informaciją. Nustačius persidengiančius chromosominius pokyčius keliems pacientams, įmanomas naujų sindromų apibūdinimas „pirma genotipas“ principu, kai nustatoma, kad persidengiantys genominiai pokyčiai yra susiję su panašiais klinikiniais požymiais. Nepaisant to, kad dėl žymios genetinių technologijų pažangos dismorfologinė diagnostika užleidžia vietą molekulinei, gydytojo genetiko vaidmuo išliks nepamainomas interpretuojant patologinius

rezultatus, koreliuojant genomini pokytį su paciento fenotipu ir nustatant klinikinę reikšmę pacientui ir jo šeimai.

4.4 ŽINOMO GENO REGULIACINĖS SRITIES IDENTIFIKAVIMAS

Tikslus chromosominių pokyčių vietos ir dydžio nustatymas, taikant didelės skiriamosios gebos molekulinio kariotipavimo technologijas, ne tik suteikė unikalią galimybę identifikuoti naujus mikrodelecinius/ mikroduplikacinius sindromus, detalizuoti žinomų sindromų fenotipinius požymius, išaiškinti kliniškai atpažįstamų sindromų genetines priežastis ir nustatyti kritinius genus, bet taip pat naudingas identifikuojant genų raiškai svarbias reguliacines sekas. Vienai iš šio mokslinio darbo tiriamųjų nustatyta 5q35.3 mikroduplikacija, tačiau pacientės fenotipas buvo nesuderinamas su iki šiol žinomais duomenimis apie šios srities duplikacijų klinikines pasekmes. Detali pacientų su 5q35.3 mikroduplikacijomis genotipo-fenotipo ryšio analizė padėjo atskleisti DNR sritį, kuri gali būti reikšminga gerai žinomo *NSD1* geno raiškai.

I pacientė

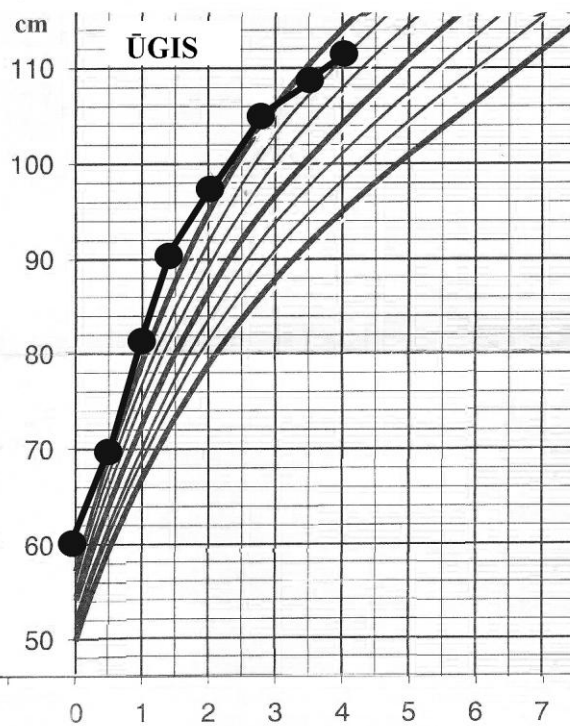
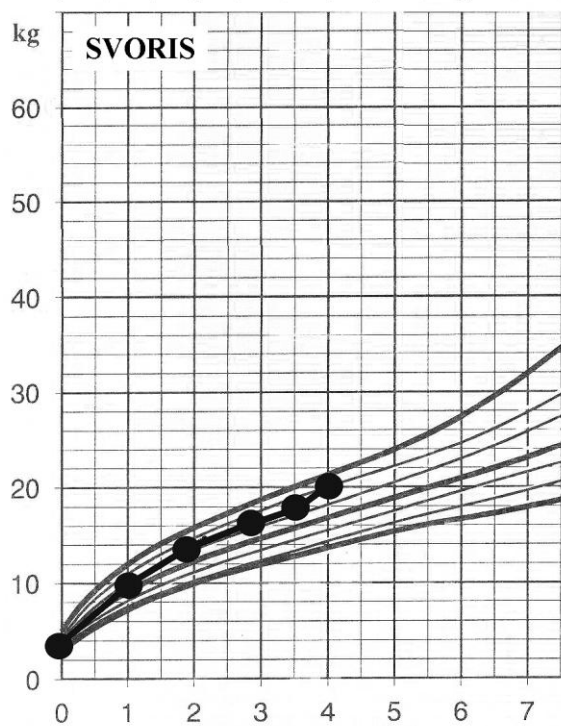
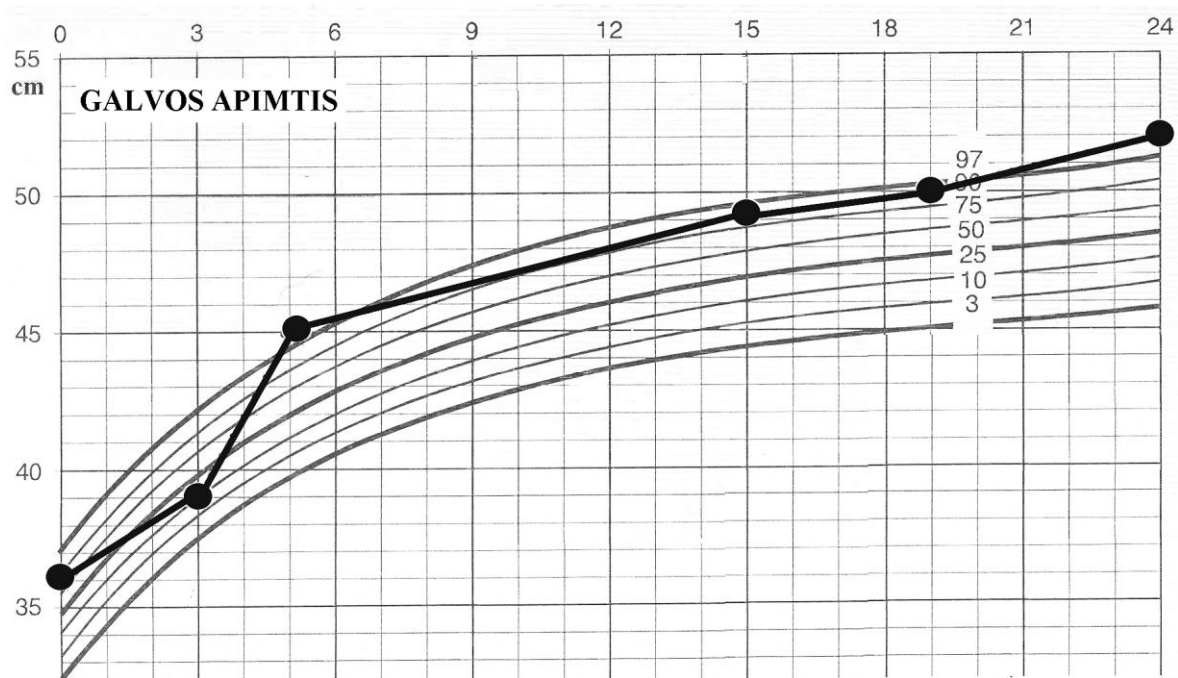
5 mėn. amžiaus mergaitė gydytojo vaikų neurologo buvo nukreipta gydytojo genetiko konsultacijai dėl įtariamo Miller-Dieker sindromo. Genealogijos duomenimis, pacientė turėjo sveiką sibsą, pirmasis motinos nėštumas baigėsi spontaniniu nėštumo nutrūkimu I trimestro laikotarpiu, trečiasis – negimdinis. Probandė gimė 38 gest. sav. iš IV nėštumo, kurio metu stebėtas polihidramnionas. Jos svoris gimus buvo 3360 g (75 ‰), ūgis 60 cm (>99 ‰), galvos apimtis 36 cm (>97 ‰). Apgar įvertinimas 1/5 min. buvo 9/9 balai. Gimdymo metu lūžo probandės raktikaulis. Neonatalinis laikotarpis buvo kompliktuotas dėl maitinimo problemų, hipotonijos, hiporefleksijos, traukulių, užsitęsusių geltos. Atlikus galvos smegenų ultragarsinį tyrimą, nustatyta hipoplastiška didžioji smegenų jungtis, šoninių skilvelių išsiplėtimas, lisencefalijos įtarimas. Sulaukus dviejų mėnesių, pasireiškė apnėjos, stridoro, rijimo sutrikimo epizodai. Progresuojant maitinimo problemoms, 4 mėn. amžiaus vaikui buvo įterptas gastrostominis vamzdelis, kuris pašalintas 12 mėn. amžiuje. Gydytojo genetiko konsultacijos metu 5 mėn. probandės svoris buvo 6,9 kg (25 ‰), ūgis 71 cm (97 ‰), galvos apimtis 45 cm (>97 ‰). Stebėti fenotipiniai požymiai: makrocefalija, ilgas veidas, aukšta ir iškili kakta, smailas smakras, reti plaukai temporalinėse srityse, įstriži žemyn vokų plyšiai, epikantas, didelės, žemai prisitvirtinusios ausys, mikrostomija,

aukštas ir siauras gomurys, siaura krūtinės ląsta (4.10 pav.). Galvos smegenų MRT tyrimu nustatyta vidinė hidrocefalija ir demielinizacijos požymiai ties bazaliniais ganglijais. Citogenetiniu tyrimu nustatytas normalus kariotipas, 46,XX. FISH tyrimu atmestas *Miller-Dieker* sindromo įtarimas. Klinikinių duomenų pagrindu diagnozuotas *Sotos s.*, pacientė pakartotinai konsultuota 4 metų amžiaus: jos svoris buvo 20 kg (90 ‰), ūgis 111,8 cm (90-97 ‰), galvos apimtis 53 cm (>97 ‰) (4.11 pav.). Stebėti papildomi klinikiniai požymiai – psichomotorinės raidos atsilikimas, ataksinė eisena, tortikolis. 2 metų 3 mėn. mergaitės kaulinis amžius atitiko 4 metų amžių.

Atlikus vLGH tyrimą (105K), nustatyta 0,26 Mb dydžio 5q35.3 mikroduplikacija (4.12 pav.), kuri patvirtinta RL-PGR metodu. FISH analize nustatyta, kad duplikacija – tandeminė. RL-PGR metodu atlikus tėvų DNR analizę, patvirtinta *de novo* mikroduplikacijos kilmė.

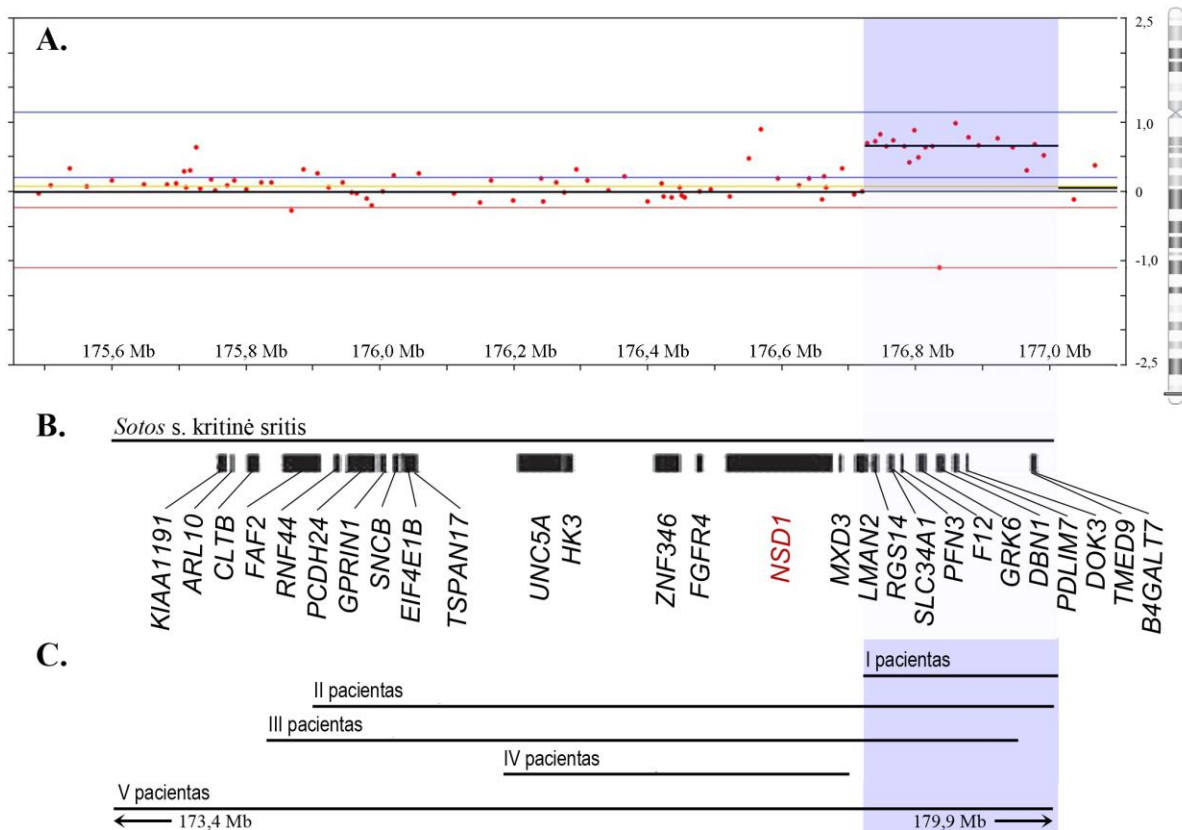


4.10. pav. I pacientės (4 m.) veidas su būdingais *Sotos s.* požymiais: ilgas veidas, aukšta kakta, smailas smakras, įstriži žemyn vokų plyšiai, epikantas, hipertelorizmas, maža nosis, mikrostomija.



J. Tutkuvienė, 2000

4.11 pav. I pacientės galvos apimtys, ūgio ir svorio augimo diagramos nuo gimimo iki 4 metų.



4.12 pav. I pacientės 0,26 Mb dydžio 5q35.3 mikroduplicacijos vaizdas (A); kritinė *Sotos* s. sritis ir joje esantys genai (B); mūsų tiriamajai ir kitiems pacientams (literatūros duomenimis) nustatytų duplikacijų schematinis vaizdas (C).

II pacientas (literatūros duomenimis)

Franno ir kiti (116) aprašė du mikroduplicacijų, apimančių 5q35.3 sritį, atvejus. Vienas iš pacientų – 33 metų amžiaus vyras, konsultuotas gydytojo genetiko dėl INN. Psichomotorinės raidos atsilikimas stebėtas nuo 4 metų. Objektyvaus tyrimo duomenys (sulaukus 33 m.): žemas ūgis, mikrocefalija, miopija. vLGH tyrimu nustatyta 5q35.2q35.3 mikroduplicacija, kuri patvirtinta RL-PGR metodu. Chromosominio pokyčio kilmė – *de novo*.

III pacientas (literatūros duomenimis)

Kitas pacientas, aprašytas Franko ir kitų (116), yra 8 metų amžiaus berniukas, turintis INN. Raidos atsilikimas buvo įtartas 5 metų amžiuje. Suėjus 7 metams, vertinti intelektiniai gebėjimai, IQ=62. Genetinės konsultacijos metu 8 metų vaikui stebėta mikrocefalija ir žemas ūgis. Galvos smegenų MRT tyrimu patologijos nenustatyta.

vLGH rezultatai – 5q35.2q35.3 mikroduplikacija, kuri patvirtinta FISH tyrimu. Duplikacijos kilmė nenustatyta.

IV pacientė (literatūros duomenimis)

Kirchhoff (117) ir kitų duomenimis, 5q35.2q35.3 mikroduplikacija buvo nustatyta 4 m. 9 mėn. amžiaus mergaitei, kuri konsultuota gydytojo genetiko dėl žemo ūgio ir nežymiai atsiliekančios psichomotorinės raidos. Apžiūros metu jos ūgis buvo <3 ‰, stebėta mikrocefalija, įstriži aukštyn vokų plyšiai, apvalus nosies galiukas, lygus filtras, plona viršutinė lūpa ir mažas smakras. SLŽA metodu nustatyta 0,52-0,65 dydžio 5q35.2q35.3 mikroduplikacija, *de novo* kilmės.

V pacientė (literatūros duomenimis)

Chen publikavo 5q35.2q35.3 duplikacijos klinikinį atvejį (118). Aprašyta pacientė buvo 11 metų amžiaus. Gimė 39 gest. sav., <3 ‰ svorio. 2 metų vaikui operuotos kirkšninės išvaržos abipus. Sulaukus 5 metų, diagnozuotas vidutinis protinis atsilikimas. Objektivaus tyrimo duomenys (11 metų): svoris <3 ‰, žemas ūgis (<3 ‰), mikrocefalija, ovalo formos veidas, žema ir nuskliasta kakta, žvairumas, maža nosis, aukšta nosies nugarėlė, mikrostomija, nuleisti žemyn lūpų kampai, plona viršutinė lūpa, brachidaktilija, deformuotas V pirštas. Kariotipo tyrimu nustatyta 5q35.2q35.3 duplikacija, patvirtinta FISH tyrimu.

Rezultatų aptarimas

Paprastai manoma, kad kopijų skaičiaus pokyčių nulemti klinikiniai požymiai priklauso nuo delecijoje arba duplikacijoje esančių kritinių genų dozės padidėjimo arba sumažėjimo. Mokslinėje literatūroje paskelbti keturi 5q35.3 duplikacijos atvejai (II-V pacientai) – du atvejai identifikuoti vLGH (116), vienas SLŽA (117) ir vienas FISH metodu (118). Visiems jiems būdingas specifinis fenotipas – mikrocefalija, žemas ūgis ir psichomotorinės raidos atsilikimas. Atkreiptas dėmesys į šioje srityje esantį *NSDI* geną. Žinoma, kad šis genas yra jautrus dozei ir jo haplonepakankamumas lemia *Sotos* sindromą. 5q35.3 duplikacijos atvejai rodo, kad *NSDI* dozės perteklius gali būti susijęs su atvirkščiu fenotipu – mikrocefalija ir žemu ūgiu.

NSDI geno produkto, NSD1 baltymo raiška aktyvi vaisiaus ir suaugusio žmogaus smegenyse, inkstuose, skeleto raumenyse, blužnyje, užkrūčio liaukoje ir plaučiuose (119). Šio baltymo sudėtyje yra bent 12 funkcinių domenų (120). Jis randamas branduolyje ir galbūt veikia kaip transkripcinis veiksnys, priklausomai nuo aplinkos ląstelėje, galintis teigiamai ir neigiamai veikti transkripciją (119). Atsižvelgiant į *NSDI* geno delecijų, susijusių su pagreitėjusio augimo klinika, ir priešingą fenotipą lemiančių reciprokinių duplikacijų atvejus, geno funkcija gali būti susijusi su somatinių ląstelių augimu, tačiau nėra žinomas konkretus funkcinis sutrikimas, lemiantis *Sotos* ar jam priešingą 5q35.3 duplikacijos sindromus.

Mūsų pacientei (I pacientė) nustatyta duplikacija unikali tuo, kad būdama *Sotos* s. kritinėje srityje, lemia *Sotos* s. klinikinius požymius, kurie įprastai pasireiškia dėl *NSDI* geno haplonepakankamumo. Aptikta duplikacija yra 260 kb dydžio ir apima 10 genų (*RGS14*, *SLC34A1*, *PFN3*, *F12*, *GRK6*, *DBN1*, *PDLIM7*, *DOK3*, *TMED9*, *B4GAL*), esančių už *NSDI* geno. Atstumas nuo *NSDI* geno iki pirmojo zondo duplikacijos srityje yra 69 kb. Taigi šiuo atveju nėra *NSDI* geno dozės pokyčio. Atsižvelgiant į tai, kad mūsų pacientei pasireiškė *Sotos* s. būdingi klinikiniai požymiai (pagreitėjęs augimas, makrocefalija, specifiniai veido dismorfiniai požymiai, psichomotorinės raidos atsilikimas), ir faktą, kad duplikacija yra netoli kritinio šiam sindromui geno, tikėtina, jog *NSDI* geno raiška šiuo atveju yra sutrikdyta ir pasireiškia haplonepakankamumu. Duplikacija gali nutraukti *NSDI* geno raiškai svarbias reguliacines sekas arba lemti geno raišką sutrikdantį pozicijos efektą.

Taigi mūsų pacientei nustatytos duplikacijos klinikinės pasekmės įrodo, kad vertinant kopijų skaičiaus pokyčių patogeniškumą, nepakanka atsižvelgti į pokyčio pobūdį, dydį ir genų kontekstą. Svarbu įvertinti ir šalia esančius dozei jautrius genus, kurių raiškos sutrikdymas gali lemti chromosominiam pokyčiui neadekvačias klinikinės pasekmes.

4.5 SUDĖTINGŲ CHROMOSOMINIŲ PERSITVARKYMŲ KLINIKINĖS PASEKMĖS IR GENETINIO KONSULTAVIMO YPATUMAI

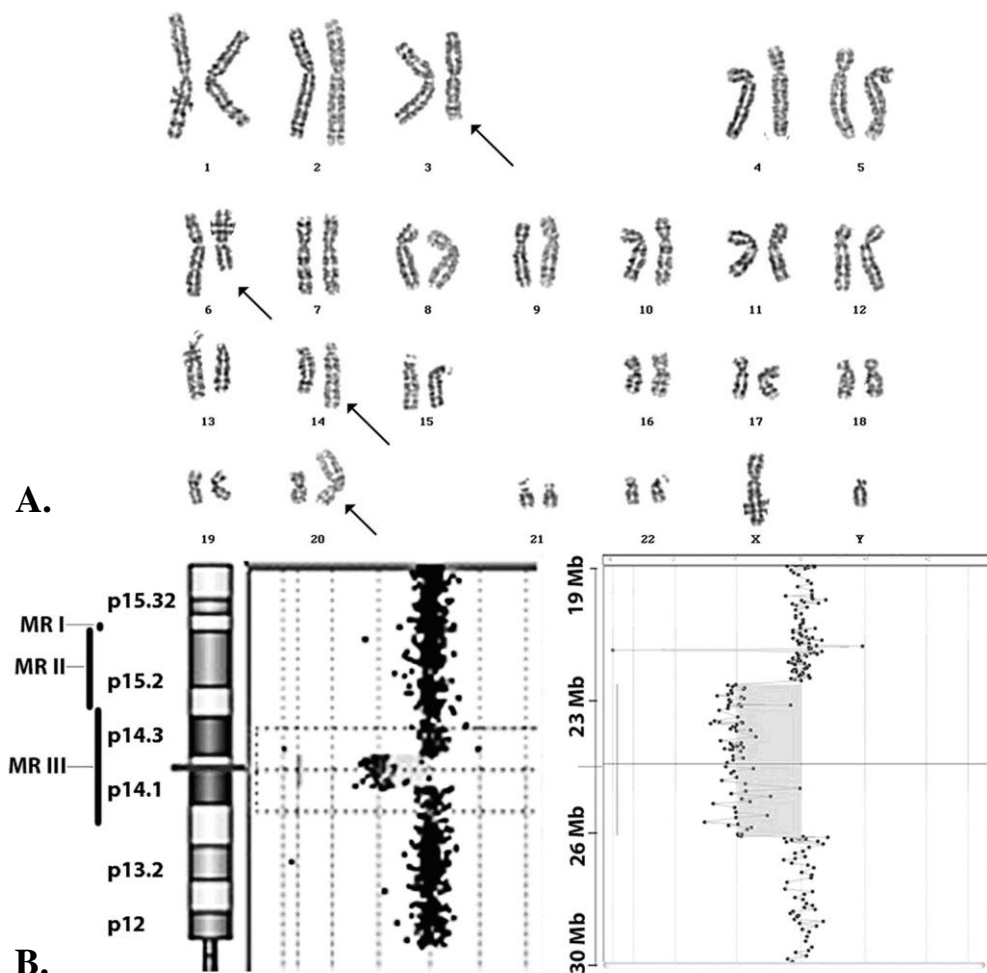
Nesubalansuotos translokacijos, lemiančios embriono ar vaisiaus žūtį ir daugines raidos anomalijas bei psichomotorinės raidos sutrikimą gyvagimiams dėl tam tikrų chromosomų segmentų (paprastai terminalinių chromosomų dalių) delecijų ir duplikacijų, dažniausiai nustatomos asmenims, kurių vienas iš tėvų yra subalansuotos translokacijos nešiotas arba veikiant chromosomų stabilumą sutrikdantiems genetiniams, epigenetiniams ar aplinkos veiksniams. Iš 29 tiriamųjų, kuriems nustatyti patogeniniai kopijų skaičiaus pokyčiai molekulinio kariotipavimo tyrimu, 7 pacientams (24 %) aptiktos nesubalansuotos translokacijos ir kiti sudėtingi chromosominiai persitvarkymai. Penkiems probandams nustatyti dvigubi genetiniai pokyčiai – delecijos ir duplikacijos. Pokyčio kilmės nustatymas – paveldėtas iš vieno iš tėvų, subalansuotos translokacijos nešiotas ar *de novo* – ypatingai svarbus dėl prognozės šeimai kitiems palikuonims suteikimo. Tačiau, nors molekulinis kariotipavimas yra efektyvus metodas nustatant pacientų, turinčių INN, molekulinę diagnozę, svarbu nepamiršti ir šio metodo trūkumų. Molekuliniu kariotipavimu neaptinkami subalansuoti chromosominiai persitvarkymai, tokie, kaip reciprokinės translokacijos, Robertsoninės translokacijos ir inversijos. Vidutiniškai 6 % gimusiųjų, kuriems nustatytos subalansuotos chromosominės aberacijos, pasireiškia psichomotorinės raidos atsilikimas ar įgimtos anomalijos (121). Hochstenbach duomenimis (122), molekulinį kariotipavimą taikant neatlikus tradicinio kariotipo tyrimo, neaptinkama apie 0,78 % potencialiai patogeninių subalansuotų persitvarkymų. Rezultatuose pateikiama 5p14.3-p14.1 mikrodelecijos ir dvigubos subalansuotos translokacijos atvejo klinikinė ir molekulinė analizė.

Klinikinis ir molekulinis 5p14.3-p14.1 mikrodelecijos ir dvigubos subalansuotos translokacijos apibūdinimas

Pacientui su sunkiu psichomotorinės raidos atsilikimu ir sudėtinga tikėtina subalansuota chromosomine translokacija vLGH tyrimu nustatyta su chromosomų trūkių taškais nesusijusi submikroskopinė delecija, lemianti *Cri du chat* sindromą

(MIM 123450). Paciento kliniskus požymius galėjo apsunkinti dviguba subalansuota chromosominė translokacija, neaptinkama molekulinio kariotipavimo metodais.

Pacientas buvo vienas iš dizigotinių dvynių, gimęs 38-ą gest. savaitę. Probando svoris gimus buvo 3,4 kg (25 ‰), ūgis 52 cm (25 ‰), galvos apimtis 33 cm (3 ‰). Konsultuotas gydytojo genetiko 2 mėn. dėl priekinio momenėlio ankstyvo užsidarymo ir psichomotorinės raidos atsilikimo. Jo dvynės sesers raida buvo normali. Apžiūros metu nustatyti fenotipiniai požymiai: mikrocefalija (galvos apimtis 35 cm, <3 ‰), nuožulni kakta, didelės ausys, trumpas kaklas, kelių valgus deformacija. Šešių mėnesių probandui pasireiškė traukuliai, skirtas gydymas valproine r. Probandas pakartotinai konsultuotas, sulaukus 4 metų: jo ūgis buvo 87 cm (<3 ‰), svoris 11 kg (<3 ‰), galvos apimtis 42,5 cm (<3 ‰), nustatyta optinių diskų atrofija, sunkus



4.13 pav. A. Kariotipo tyrimu nustatyta translokacija 46,XY,t(3,14)(q12;q11.2), t(6;20)(q21;p11.2). B. vLGH tyrimu nustatyta 3,9 Mb dydžio mikrolelecija 5p14.3-p14.1 srityje; kairėje schemos pusėje pažymėti MRI, MR II ir MR III regionai.

psichomotorinės raidos atsilikimas – berniukas negali pakelti galvos, sėdėti savarankiškai, nėra kalbos elementų.

Kariotipo tyrimu iš periferinio kraujo limfocitų nustatyta dviguba tikėtina subalansuota translokacija 46,XY,t(3,14)(q12;q11.2), t(6;20)(q21;p11.2). Citogenetinius tyrimus atlikus tėvams, patvirtinta jos *de novo* kilmė (4.13 A pav.). Translokacija patvirtinta FISH tyrimu naudojant dviejų spalvų chromosomų tapymo zondus. Atlikus vLGH (105K) tyrimą, patvirtinta, kad translokacijos subalansuotos, tačiau aptikta 3,9 Mb dydžio mikrodelecija 5p14.3-p14.1 srityje (4.13 B pav.). Mikrodelecija patvirtinta ir jos *de novo* kilmė nustatyta RL-PGR metodu.

Rezultatų aptarimas

Cri du chat sindromui būdinga INN, panašus į katės kniaukimą verksmas ir specifiniai dismorfiniai požymiai – apvalus veidas, hipertelorizmas, žema ausų kaušelių padėtis, mažas apatinis žandikaulis. Klinikinių požymių spektras ir sunkumas priklauso nuo delecijos dydžio ir lokalizacijos. Zhang ir kiti (123) atliko vLGH tyrimą 94 pacientams su *Cri du chat* sindromu ir išskyrė tris chromosominius regionus (MRI-MRIII) 5p srityje, kurie susiję su skirtingu INN pasireiškimo laipsniu (4.13 B pav.). Autorių nuomone, reikšmingiausias – 1,2 Mb dydžio MRI regionas, esantis 5p15.31 srityje. Esant delecijoms šioje srityje, pacientams pasireiškė sunki INN. Delecijos proksimaliau MRI regiono esančiuose MRII ir MRIII regionuose susijusios su lengvesniais klinikiniais požymiais (123). Kitų tyrėjų duomenimis (124, 125), veido dismorfinius požymius, specifinį verksmą ir kalbos raidos sutrikimus lemia delecijos distalinėje 5p dalyje. Pastaraisiais metais šios koreliacijos buvo atnaujintos naudojant molekulinis duomenis, gautus molekulinio kariotipavimo tyrimais. Specifinis verksmas siejamas su 1,5 Mb dydžio distaline 5p15.31 sritimi, kalbos raidos atsilikimas – 3,2 Mb 5p15.32- 15.33 sritimi, veido dismorfiniai požymiai – 2,4 Mb dydžio 5p15.2-15.31 sritimi (123).

Delecija, nustatyta mūsų pacientui, nėra didelė ir apsiriboja MRIII regionu. Taigi vadovaujantis ankstesnių tyrimų genotipo-fenotipo ryšio analizės duomenimis, esant tokiai delecijai, tikėtina lengva INN. Nors *Cri du chat* sindromui būdingi įvairaus sunkumo fenotipiniai požymiai, mūsų pacientui nustatytas chromosominio

pokyčio dydis ir lokalizacija nepaaiškina sunkių klinikinių požymių pasireiškimo. Negalima atmesti, kad paciento fenotipui reikšmingą įtaką galėjo daryti vieno ar daugiau iš keturių chromosominių trūkio taškų (3, 6, 14 ir 20 chromosomose), susijusių su dviguba subalansuota traslokacija, poveikis.

Dauguma anksčiau aprašytų *Cri du chat* sindromo atvejų yra dėl 5p delecijų arba citogenetiškai aptiktų struktūrinių 5 ir kitos chromosomos persitvarkymų. Publikuoti keli 5p delecijos ir nesusijusio su delecija kito nesubalansuotumo atvejai. Su *Cri du chat* sindromu siejamas kompleksinių chromosominių pokyčių dažnis – 12-16 %, daugumai iš šių pacientų nustatoma papildoma aberacija 5 ar kitoje chromosomoje (123, 125, 126). Mūsų pacientui nustatyta 5p delecija nėra susijusi su dviguba subalansuota translokacija, tokio chromosominio persitvarkymo priežastys ir mechanizmai nėra žinomi. Warburton ir kitų duomenimis (127), rizika raidos defektui, esant vienam chromosominiam trūkiui, lygi 3,5 %. Taigi mūsų tiriamajam su dviguba subalansuota translokacija raidos defektų rizika didėja iki 14 %. Didėjant chromosominiam kompleksiskumui, didėja ir tikimybė, kad geno nutraukimas, pozicinis efektas, recesyvi mutacija dėl translokacijos gali lemti sunkias fenotipines anomalijas (128). Išanalizavus genominę informaciją mūsų pacientui nustatytose chromosomų trūkių srityse, nustatyta, kad 6q21 ir 20p11.2 regionuose yra daug genų, keletas iš jų yra siejami su INN, mikrocefalija ir kitais klinikiniais požymiais, tokiais, kaip mikroftalmija, ektrodaktilija, prognatija. Duomenų, kad 3q12 ir 14q11.2 sritys gali būti susiję su INN, nepakanka. Vis dėlto, kadangi chromosominių trūkių taškai nebuvo tiksliai identifikuoti, negalima atmesti nedidelės delecijos trūkio srityje arba kito patogeninio mechanizmo, įskaitant geno nutraukimo galimybę, dariusios įtaką paciento fenotipui.

Šis atvejis demonstruoja situaciją, kai vLGH tyrimo rezultatai negali būti susieti su klinicine diagnoze, kadangi pacientui pasireiškę klinikiniai požymiai buvo sunkesni nei su nustatyta delecija koreliuojantis fenotipas ir galėjo būti nulemti kitų subalansuotų genomo persitvarkymų. Todėl esant genotipo-fenotipo nesuderinamumui, be vLGH tyrimo būtinas kariotipo tyrimas dėl galimų papildomų subalansuotų translokacijų nustatymo. Tai svarbu tikslesnei diagnostikai ir genetiniam konsultavimui.

4.6 ASMENŲ, TURINČIŲ INTELEKTINĘ NEGALIĄ, GENETINIO IŠTYRIMO GAIRĖS

Intelektinės negalios etiologinės diagnozės nustatymo sėkmė iš dalies priklauso nuo ištyrimo plano ir nuodugnumo. 1997 m. buvo suformuluotos gairės pacientams, turintiems INN, ištirti (5). Jose pabrėžiamas mažiausiai trijų kartų genealogijos įvertinimas, pre- ir postnatalinė anamnezė, objektyvus ištyrimas dėl galimų įgimtų anomalijų, dismorfinių požymių, neurologinių bei elgesio sutrikimų ir metabolinių defektų įvertinimas. 1997 m. rekomenduoti laboratoriniai tyrimai: kariotipas, tyrimas dėl lūžiosios X chromosomos, metaboliniai tyrimai esant indikacijoms, įvertinus anamnezę ir objektyvaus ištyrimo duomenis (5). Per pastaruosius 15 metų genetikos mokslas sparčiai tobulėja, atsiranda naujų ištyrimo galimybių, todėl keičiasi vaikų, turinčių INN, ištyrimo rekomendacijos (121, 129-132). Taikant etapinį diagnostinį ištyrimą, didėja diagnostinis efektyvumas ir racionaliau panaudojami brangūs tyrimo metodai. Vadovaujantis šio tyrimo rezultatais ir literatūros apžvalgų duomenimis, sudarytos pacientų, turinčių INN, genetinio ištyrimo rekomendacijos.

I etapas: pirmiausia fenotipas

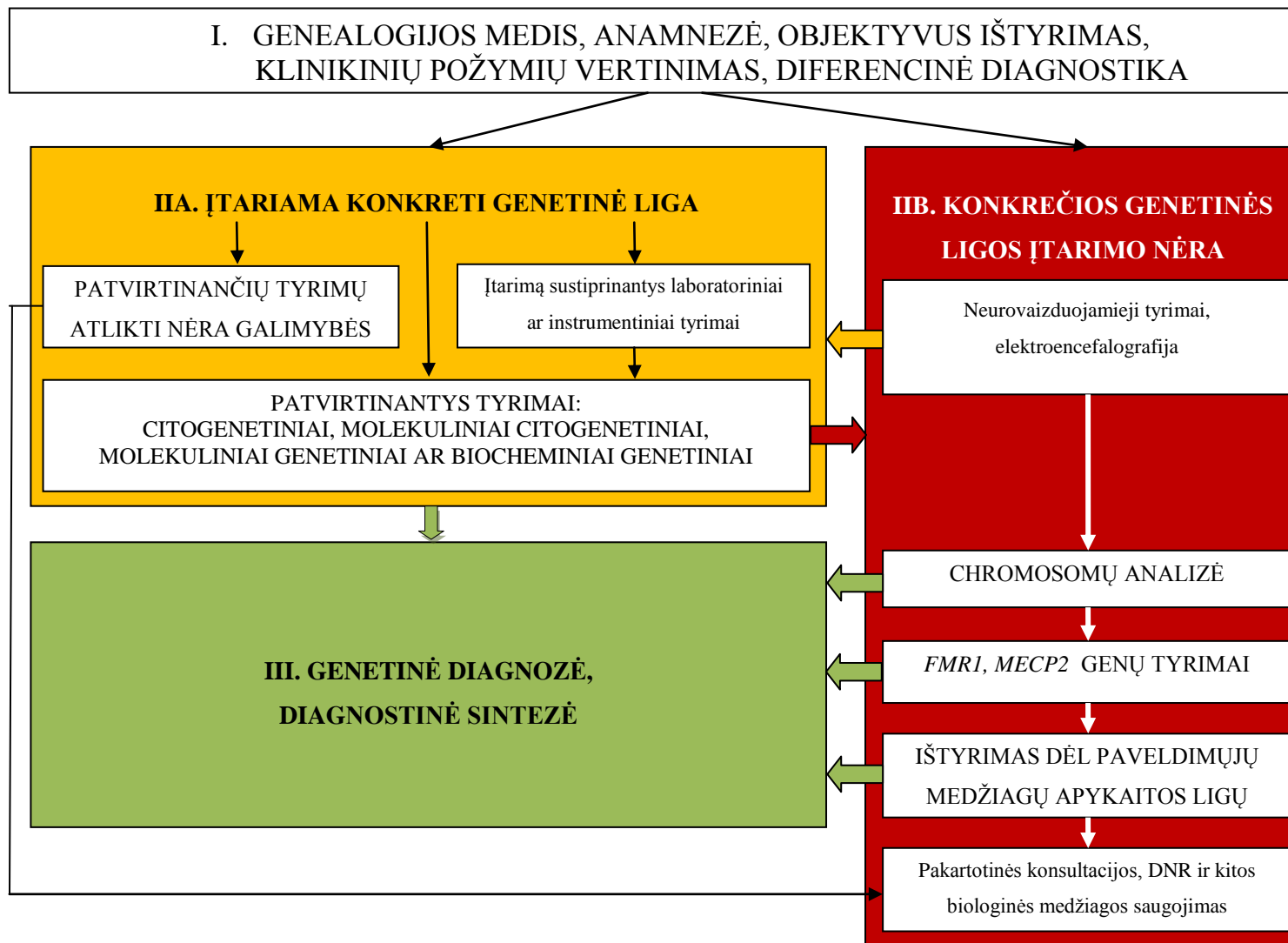
Diagnostinis ištyrimas pradedamas vadovaujantis „pirmiausia fenotipas“ principu. Šis etapas apima 5 pagrindinius žingsnius: genealogijos medis (bent trys kartos), gyvenimo ir ligos anamnezė, objektyvus ištyrimas (apžiūra, fiziniai matavimai, auskultacija, perkusija, palpacija), diferencinė diagnostika ir klinikinės diagnozės nustatymas (4.14 pav.).

Genealogijos duomenimis vertinama, ar INN pasireiškimas yra sporadinis, ar šeiminis. Jei atvejis šeiminis, nustatomas paveldėjimas (autosominis dominantinis/ recesyvinis, su X chromosoma susijęs dominantinis/ recesyvinis). Klausinama, ar tėvai nėra giminės, ar probando motinai ir kitų artimų giminaičių šeimose nėra buvę savaiminio nėštumo nutrūkimų, negyvagimių, neonatalinės mirties atvejų.

Anamnezės duomenys suteikia reikšmingos informacijos, nustatant INN etiologiją. Aktyviai klausinama dėl galimų žinomų INN priežasčių, pradedant nuo prenatalinių veiksnių, tokių, kaip infekcijos (ŽIV, CMV), motinos metabolinių ligų (diabetas, fenilketonurija), teratogenų (alkoholis, karbamazepinas, hidantoinas,

trimetadionas, retinoinė rūgštis, varfarinas, valproinė r. ir kt.) ir perinatalinių bei postnatalinių priežasčių, tokių, kaip neišnešiotumas, meningoencefalitas, galvos smegenų trauma. Renkami duomenys apie probando prenatalinį augimą, įgimtas anomalijas, lėtines ligas, psichomotorinę raidą, regą, klausą, elgesį.

Objektyvus ištyrimas yra klinikinės diagnozės nustatymo pagrindas. Ypatingas dėmesys skiriamas antropometriniams matavimams ir detaliam probando apžiūrai. Matuojamas probando ūgis, svoris, galvos ir krūtinės apimtys, vertinama galvos forma ir momenėlių dydis bei forma. Apžiūrimi plaukai, vertinama jų struktūra, ar nėra praretėjimo ir avirkščiai, padidėjusio plaukuotumo. Įvertinamas blakstienų ilgis, antakių forma ir ilgis. Vertinama akių forma, matuojamas atstumas tarp išorinių ir vidinių akių kampų; nustatoma ar yra epikantas, ar vyzdžiai normaliai reaguoja į šviesą. Apžiūrimos akių rainelės, vertinant jų spalvą ir margumą; nustatoma ar nėra kataraktos. Vertinama lūpų, nosies morfologija, ar filtrai yra normalaus ilgio. Apžiūrimas gomurys ir dantys, vertinama dantų pozicija ir tarpai tarp jų. Nustatomas ausų padėties santykis su apatinio žandikaulio kampu, įvertinamas vijoklių dydis ir forma. Apžiūrimas kaklas, vertinamas jo ilgis, nustatoma, ar yra kaklo sparneliai bei perteklinės kaklo odos raukšlės. Vertinama krūtinės ląstos forma, atstumas tarp krūtų spenelių. Išklausa širdies veikla ir kvėpavimas. Palpuojamas pilvas siekiant įvertinti, ar nepadidėjusios kepenys ir blužnis, ar nėra papildomų darinių pilve. Apžiūrimi išoriniai lytiniai organai. Tiriant kaulų sistemą, būtina įvertinti kūno proporcijas (viršutinio segmento lyginimas su apatiniu) ir stuburą (deformacijos, kaulų defektai). Apžiūrimos galūnės vertinant, ar rankų žastai proporcingi dilbiams, kojų šlaunys – blauzdoms. Tikrinamos judesių amplitudės. Apžiūrimos plaštakos ir pėdos, nustatomos delnakaulių/ padikaulių ir pirštakaulių ilgių proporcijos. Tiriama rankų ir kojų pirštai, nagai, vertinama pastarųjų forma, ilgis ir padėtis. Apžiūrimos delno raukšlės. Odoje svarbu pastebėti pigmentacijos pokyčius, balintos kavos dėmės, odos išaugas, kraujagyslines dėmes ir angiofibromas. Hipopigmentinės dėmės vertinamos naudojant Wood'o lempą. Visada naudinga nufotografuoti pastebėtas anomalijas ir pacientą bendrai (visu ūgiu iš priekio, profiliu, veidą iš priekio ir profiliu, plaštakas, pėdas). Tuomet patogiau pakartotinai apžiūrėti, aptarti pacientą.



4.14 pav. Pacientų, turinčių intelektualinę negalią, ištyrimo schema

Objektyvus tyrimas vertinamas kartu su kitų gydytojų specialistų atlikto neurologinio, kardiologinio ištyrimo duomenimis, regos, klausos patikrinimu, pilvo, inkstų echoskopinių tyrimų išvadomis. Pirmų trijų ištyrimo žingsnių diagnostinis našumas – 17-34 % (133, 134).

Diferencinė diagnostika atliekama naudojant duomenų bazines (London Medical Databases, POSSUM ar kitas). Pagal tai, ar pavyksta suformuoti **klinikinę diagnozę**, vadovaujantis genealogijos, anamnezės ir objektyvaus tyrimo duomenimis, pasirenkamas tolesnis tyrimo etapas.

IIA etapas atliekamas, jeigu pirmojo ištyrimo etapo metu įtariama genetinė liga (nustatoma klinikinė diagnozė). Jeigu klinikinė diagnozė yra abejotina esant indikacijoms, atliekami klinikinės diagnozės įtarimą sustiprinantys tyrimai (laboratoriniai, instrumentiniai). Esant galimybei, klinikinė diagnozė patvirtinama atliekant specifinius genetinius tyrimus, pavyzdžiui, *Down* sindromas diagnozuojamas atlikus kariotipo tyrimą, *Di George* – FISH, *Angelman* ir *Prader-Willi* sindromų patvirtinimui atliekamas 15q11-q13 srities delecijų/ duplikacijų ir metilinimo tyrimas, esant lūžiosios X chromosomos sindromo įtarimui – *FMRI* geno tyrimas, *Pompė* ligai – fermento α -glikozidazės aktyvumo tyrimas ir t. t.

IIB etapas

Jei įtarta klinikinė diagnozė nepatvirtinta ir tais atvejais, kai I etapo metu nepavyksta suformuoti klinikinės diagnozės, atliekama tyrimų seka: neurovaizduojamieji tyrimai, elektroencefalografija, vektorinė lyginamoji genomo hibridizacija (ar kiti molekuliniai citogenetiniai, molekuliniai genetiniai, citogenetiniai tyrimai nespecifinei visų chromosomų/ genomo ar subtelomerinių chromosomų dalių analizei), *FMRI* geno tyrimas ir ištyrimas dėl paveldimųjų medžiagų apykaitos ligų (4.14 pav.).

Neurovaizduojamieji tyrimai. Intelektinė negalia pasireiškia dėl galvos smegenų funkcijos sutrikimo, kurio galimos priežastys – morfogenezės ar histogenezės sutrikimai raidos metu. Kai neaptinkama kitų diagnostikai svarbių klinikinių požymių, neurovaizduojamieji tyrimai gali suteikti reikšmingos diagnostinės informacijos. Šie tyrimai indikuotini kartu su INN esant neurologinei simptomatikai. Struktūrinės galvos smegenų anomalijos nustatomos 55,3 % ir 39 %

tiriamųjų atitinkamai galvos smegenų magnetinio rezonanso tomografijos (MRT) ir kompiuterinės tomografijos (KT) tyrimais (135). Abiejų tyrimų diagnostinis našumas (patogeninių pokyčių nustatymas) didėja, jeigu jie atliekami pacientams, kuriems būdinga mikrocefalija ar makrocefalija ir papildomi neurologiniai simptomai, pvz., hipertoniškumas, spastiškumas, traukuliai, pusiausvyros ir eisenos sutrikimai. Įgimtų galvos smegenų anomalijų aptikimas gali padėti nustatyti sutrikimo priežastį, pvz., mielinizacijos sutrikimas, didžiosios smegenų jungties agenezė ar hipoplazija, smegenėlių hipoplazija yra būdingi *Smith-Lemli-Opitz* sindromui požymiai. *FG* sindromui būdinga didžiosios smegenų jungties agenezė, periventrikulinės mazginės heterotopijos, smegenėlių kirmino defektas ir kitos anomalijos. Galvos smegenų MRT tyrimas yra pirmo pasirinkimo tyrimas lyginant su KT, kuris labiau tinkamas tik pacientams su kraniosinostoze ir kalcifikatais.

Elektroencefalografija. Nepaisant to, kad epilepsija dažnai pasireiškia esant INN, elektroencefalografijos (EEG) diagnostinis efektyvumas (specifinės diagnozės nustatymas atlikus tyrimą) yra mažas (0.4-1 %) (135). Vis dėlto, jei įtariamas epileptinis sindromas (pvz., *Lennox-Gastaut*, miokloninė epilepsija, *Rett* sindromas), EEG radiniai turi diagnozę patvirtinančios reikšmės. Be to, specifiniai EEG rezultatai būdingi bent dviem būklėms: esant lūžiosios X sindromui ir *Angelman* sindromui.

Molekulinis kariotipavimas: pirmiausia genotipas. Chromosominiai pokyčiai priskiriami dažniausioms šiandien žinomoms genetinėms INN priežastims. Akivaizdu, kad kiekvienas citogenetinio tyrimo technologinis progresas padidina diagnozės nustatymo tikimybę asmenims su kognityviniais sutrikimais. Pagal ankstesnes rekomendacijas, visiems pacientams, turintiems INN, nepriklausomai nuo to, ar tai sindrominis, ar izoliuotos INN pasireiškimas, turi būti atliekamas chromosomų ištyrimas mikroskopu – kariotipo tyrimas. Vis dėlto pacientams be dismorfinių požymių mikroskopu matomų chromosominių pokyčių nustatoma tik <1 % atvejų (136). 2003 m. pacientų su INN ar dauginiais raidos defektais submikroskopinių chromosominių nesubalansuotų persitvarkymų nustatymui pradėjus taikyti vektoriais pagrįstą metodą (137), ženkliai pagerėjo INN genetinių priežasčių nustatymo efektyvumas. Liang ir kitų duomenimis (43), patogeniniai kopijų skaičiaus pokyčiai molekulinio kariotipavimo tyrimu nustatomi 5-15 % asmenų, turintiems

INN. Šio mokslinio tyrimo rezultatai patvirtinta didelį molekulinio kariotipavimo diagnostinį efektyvumą: tiriant pacientus, kuriems kariotipo tyrimu nenustatyta patologija, molekulinio kariotipavimu INN genetinės priežastys išaiškintos 13,7 % pacientų. 9,5 % tiriamųjų nustatyti chromosominiai pokyčiai nebuvo susiję su žinomais mikrodeleciniiais/ mikroduplikaciniais sindromais. Esant tokiam tyrimo efektyvumui, keičiamos asmenų asmenų, turinčių INN, rekomendacijos (138-140). Kai paciento klinikiniai požymiai nekelia specifinės klinikinės diagnozės įtarimo (nepasiteisina principas „pirmiausia fenotipas“), molekulinis kariotipavimas labai efektyvus ne tik molekulinės diagnozės nustatymo prasme, bet ir atskleidžiant naujus mikrodelecinius ar mikroduplikacinius sindromus. Tai vadinama „atvirkščios dismorfologijos“ arba „pirmiausia genotipas“ principu, kuriuo naujas genomis sutrikimo apibūdinimas prasideda nuo vieno ar kelių pacientų, turinčių INN, ir palaipsniui plėtėja iki šio chromosominio pokyčio paieškos didelėje pacientų, turinčių INN, kohortoje. Esant genotipo-fenotipo nesuderinamumui, be vLGH tyrimo, būtinas standartinis kariotipo tyrimas dėl galimų papildomų subalansuotų translokacijų nustatymo. Kariotipo tyrimas (kaip pirmo pasirinkimo tyrimas) indikuotinas pacientams su akivaizdžiu chromosominiu sindromu (pvz., *Down* sindromas), esant chromosominiams persitvarkymams šeimos nariams arba pasikartojantiems persileidimams šeimos anamnezės duomenimis. Jei molekulinio kariotipavimo tyrimo nėra galimybės atlikti visiems pacientams, turintiems INN, pagrindiniai atrankos kriterijai šiam tyrimui – sindrominė INN ir specifiniai klinikiniai požymiai (įgimta didžiosios smegenų jungties formavimosi yda, ausų mikroanomalijos, brachidaktilija). Nesant molekulinio kariotipavimo galimybei, rekomenduojamas standartinis kariotipo tyrimas (diagnostinis efektyvumas 3-5 %) ir subtelomerinis SLŽA arba subtelomerinis FISH tyrimas (diagnostinis efektyvumas 3-8 %).

***FMRI, MECP2* genų tyrimai.** Lūžiosios X chromosomos sindromas – tai dažnas genetinis sutrikimas, kurį lemia X chromosomoje esančio *FMRI* geno dinaminė mutacija – trinukleotidinis išsiplėtimas. Sindromui būdingas plataus spektro fizinės, elgesio, kognityvinės, psichiatrinės ir medicininės problemos, kurios būna labiau išreikštos vyrams nei moterims. Diagnostinis *FMRI* geno tyrimo efektyvumas vyriškos lyties asmenims – 0,7-7,6 % (135).

Manoma, kad *Rett* sindromas yra viena dažniausių INN priežasčių mergaitėms (ligos dažnis 1-3:10,000). Jį lemia *MECP2* baltymo stoka, kuris jungiasi su chromatinu ir reguliuoja transkripciją. Tipiniam *Rett* sindromui nebūdingi dismorfiniai požymiai, tačiau stebimas žymus kognityvinis sutrikimas, komunikacijos disfunkcija, stereotipiniai judesiai, augimo atsilikimas, visa tai pasireiškia po normalių 6-18 pirmųjų gyvenimo mėnesių periodo. *MECP2* geno molekulinis genetinis tyrimas rekomenduojamas visoms mergaitėms, turinčioms sunkią INN, netgi jei nėra specifinių *Rett* sindromui klinikinių požymių (diagnostinis efektyvumas 1,5 %) (131).

Ištyrimas dėl paveldimų medžiagų apykaitos ligų pradedamas I pasirinkimo laboratoriniais biocheminiais ir biocheminiais genetiniais tyrimais – bendras kraujo tyrimas, gliukozė, kepenų fermentai, kreatinkinazė, šlapimo rūgštis, amoniakas, T4, T3, TSH, kiekybinis aminorūgščių kraujo plazmoje tyrimas, glikozaminoglikanai šlapime. Jei duomenų diagnozei patvirtinti nepakanka, skiriami II pasirinkimo biocheminiai ir biocheminiai genetiniai tyrimai – aminorūgštys, organinės rūgštys šlapime, transferino izoelektrinis fokusavimas, oligosacharidai, varis, ceruloplazminas. II pasirinkimo tyrimai rekomenduojami esant neurologinei simptomatikai. Metaanalizės duomenimis, rutiniškai atliekant šiuos tyrimus, jų diagnostinis našumas yra žemas (0,6-1,3 %) (141). Tačiau atsižvelgiant į tai, kad daugumai paveldimų medžiagų apykaitos ligų be INN būdingi ir kiti klinikiniai požymiai (augimo atsilikimas, raidos regresas, epizodinė dekompensacija, hepatosplenomegalija, grubūs veido bruožai), rekomenduojama laboratorinius tyrimus dėl paveldimų medžiagų apykaitos ligų atlikti selektyviai, vadovaujantis klinikiniais ir fizinio ištyrimo duomenimis, ir etapiškai, kitus tyrimus atliekant atsižvelgiant į gautų tyrimų rezultatus. Laikantis tokios taktikos, ištyrimo dėl paveldimų medžiagų apykaitos ligų efektyvumas išauga iki 13,6 % (142).

III etapas: diagnostinė sintezė

Nustačius genetinę diagnozę, sudaromas paciento tolesnio stebėjimo, gydymo planas. Tačiau netgi jei diagnostikai būtų panaudoti visi šiai dienai prieinami genetiniai tyrimai, vis tiek liktų pacientų su nežinoma INN priežastimi. Be to, ne visada įmanoma atlikti tyrimą, kuris reikalingas įtariamai diagnozei patvirtinti. Nenustačius

genetinės diagnostikos, svarbu saugoti paciento DNR ar ląstelių liniją. Skiriamos pakartotinos reguliariai suplanuotos konsultacijos, vertinami nauji klinikiniai požymiai, atliekami naujai atsiradę tyrimai.

Laukiama tolesnė technologijų pažanga, svarbi tiriant kitus genetinius mechanizmus, pvz., somatinės mutacijos, epigenetinės reguliacijos sutrikimai ir poligeniniai pokyčiai, kurių kiekvienas, tikėtina, yra atsakingas už svarbią dalį INN atvejų. Neabejojama viso egzomo ir genomo sekvenavimo metodo sėkme monogeninių INN priežasčių diagnostikoje (143, 144).

V. IŠVADOS

1. Molekulinio kariotipavimo diagnostinis efektyvumas, tiriant Lietuvos pacientus, turinčius nežinomos etiologijos INN, yra 13,7 %. Atmetus žinomus mikrodelecinių/ mikroduplikacinių sindromų atvejus, molekulinio kariotipavimo efektyvumas, nustatant naujus patogeninius kopijų skaičiaus pokyčius, yra 9,5 %.
2. Įgimta didžiosios smegenų jungties formavimosi yda, ausų mikroanomalijos ir brachidaktilija yra chromosominius pokyčius prognozuojančios fenotipinės anomalijos (atitinkamai $p=0,006$, $p=0,006$, $p=0,004$). Chromosominiams pokyčiams būdingų specifinių fenotipinių požymių vertinimas asmenims, turintiems INN, padėtų tikslingiau atrinkti pacientus efektyviam molekulinio kariotipavimo tyrimui.
- 3.1 7p22.1 srities mikroduplikacija lemia raidos atsilikimą, kraniofacialinį dismorfizmą ir skeleto anomalijas. 17q21.22 mikrodelecija susijusi su INN, augimo atsilikimu ir dismorfniais veido požymiais. Tai galimi nauji mikrodeleciniai/ mikroduplikaciniai sindromai, kurių patvirtinimui būtini papildomi pacientų su persidengiančiais chromosominiais pokyčiais klinikiniai ir molekuliniai duomenys.
- 3.2 Nustatytas kraniofacialinės raidos sutrikimui stiprus kandidatinis genas – *ACTB* genas. *ERBB4* *CAD10* ir *CACNA1G* genų haplonepakankamumas gali būti reikšmingas kognityvinių funkcijų sutrikimui.
- 4 *NSD1* geno raiškai gali būti reikšminga 264 kb dydžio sritis, esanti 63 kb už *NSD1* geno.
- 5 Kai molekulinio kariotipavimo tyrimu aptikto patogeninio kopijų skaičiaus pokyčio ryšys su paciento klinikiniais požymiais yra abejotinas, indikuotini citogenetiniai tyrimai dėl subalansuotų chromosominių persitvarkymų nustatymo.
- 6 Esant dideliam molekulinio kariotipavimo diagnostiniam efektyvumui ir atsižvelgiant į tai, kad didžioji dalis nustatytų patogeninių chromosominių pokyčių yra nesusiję su žinomais sindromais, molekulinis kariotipavimas rekomenduojamas kaip pirmo pasirinkimo tyrimas pacientų, turinčių INN, genetiniam ištyrimui.

I priedas. Sutikimo ir asmens informavimo formos

Versija:3

Data:2009-06-04

SUTIKIMO FORMA Dėl dalyvavimo moksliniame tyrime (Dokumentas sudarytas iš 3 puslapių)

Jūs kviečiamas dalyvauti mokslinio tyrimo programoje. Žemiau (žiūrėti “**Informacija pacientų tėvams/teisėtiems atstovams ir tiriamiems asmenims, dalyvaujantiems kontrolinėje grupėje**”) suprantama kalba jums bus pateiktos visos detalės ir paaiškinimai dėl dalyvavimo tyrime ir kas Jūsų laukia, jei sutiksite dalyvauti. Jums bus detalčiai paaiškinti visi pavojai, susiję su Jūsų sveikata ir teisėmis, kylantys dėl dalyvavimo tyrime. Be to, Jūs būsite įspėtas apie visus nepatogumus, kuriuos galite patirti. Būsime informuotas apie tai, kokią informaciją ir/ar medžiagą būsite prašomas savanoriškai pateikti tyrimui ir kas turės priėjimą prie šios informacijos ir medžiagos. Bus tiksliai apibrėžtas laikotarpis, kuriuo tyrėjai galės priėti prie informacijos ir/ar medžiagos, kurią pateiksite. Bus paaiškinti tyrimo tikslai ir ko tikimasi pasiekti, Jums dalyvaujant. Taip pat bus nurodyta tyrimo metu galimai gauta tyrėjų ir rėmėjų nauda. **Jūs neturėtumėte sutikti dalyvauti tyrime, jei kyla bet kokių abejonių dėl tyrimo ir jūsų sveikatos bei teisių. Jūs neturėtumėte sutikti dalyvauti tyrime, jei Jums jis nėra aiškus.** Nusprendę dalyvauti, Jūs turėsite pateikti informaciją ir detales apie tai, ar pastarųjų 12 mėnesių laikotarpiu nedalyvavote kokiame kitame moksliniame tyrime. Jei nuspręsite dalyvauti ir esate pacientas, jūsų sprendimas neturės įtakos ir nekeis Jūsų gydymo. **Jūs galite pasitraukti iš tyrimo bet kuriuo metu, kada panorėsite.** Jei Jūs esate pacientas, Jūsų sprendimas pasitraukti iš tyrimo neturės jokios įtakos Jūsų gydymui tuo metu ir ateityje. Jei dalyvausite tyrime, galite pateikti pagrįstus nusiskundimus bet koku atžvilgiu ar dėl bet kurio tyrėjo. Šie nusiskundimai gali būti pranešti Bioetikos komitetui, kuris pritarė tyrimui.

Ar sutikimą pasirašote už save, ar už savo vaiką/ teisėtai globojamą asmenį?	
Jei sutikimą pasirašote ne už save, parašykite, už ką, bei jo/jos vardą, pavardę	

Klausimas	Taip ar Ne
Ar pats užpildėte sutikimo dokumentus?	
Ar dalyvavote kokiame kitame moksliniame tyrime pastarųjų 12 mėnesių laikotarpyje?	
Ar perskaitėte ir pilnai supratote pateiktą informaciją apie tyrimą?	
Ar turite galimybę paklausti iškilusių klausimų apie tyrimą?	
Ar gavote adekvačius Jūsų klausimams atsakymus ir paaiškinimus?	
Ar suprantate, kad galite pasitraukti iš tyrimo bet kuriuo Jūsų pageidaujama laiku?	
Ar suprantate, kad jei pasitrauksite iš tyrimo, Jūs neturėsite niekam aiškinti tokio sprendimo priežasčių?	
Ar suprantate, kad jei pasitrauksite iš tyrimo, tai neturės jokių pasekmių Jūsų dabartiniam ar būsimam ateityje galimam terapiniam gydymui?	
Ar sutinkate dalyvauti tyrime?	
Ar sutinkate dalyvauti kontrolinėje grupėje?	
Su kuo Jūs susitikote ir aptarėte tyrimą?	

Visuose šio sutikimo dokumento puslapiuose turi būti Jūsų vardas ir parašas.

Programos, kurioje Jūs kviečiamas dalyvauti, trumpasis pavadinimas
Žmogaus genomo įvairovė, jos kilmė ir fenotipinė realizacija: žmogaus genomo įvairovės ypatumų nulemti ligų patogenezės mechanizmai: vaikų protinio atsilikimo tyrimai:1)apmokymai ir atrankos kriterijų nustatymas, 2)pacientų su protiniu atsilikimu ėminių surinkimas,3) molekulinė citogenetinė analizė,4) šeimų su protiniu atsilikimu analizė,5)genų, susijusių su protiniu atsilikimu, nukleotidų sekos nustatymas, 6) informacijos skleidimas ir technologinių sprendimų panaudojimas prevencijoje.
Programos, kurioje Jūs kviečiamas dalyvauti, pagrindinis tyrėjas
Prof. habil.dr. Vaidutis Kučinskas

Pavardė:		Vardas:	
Parašas:		Data:	

SUTIKIMO FORMA Dėl dalyvavimo moksliniame tyrime (Dokumentas sudarytas iš 3 puslapių)
Programos, kurioje Jūs kviečiamas dalyvauti, trumpasis pavadinimas
Žmogaus genomo įvairovė, jos kilmė ir fenotipinė realizacija: žmogaus genomo įvairovės ypatumų nulemti ligų patogenezės mechanizmai: vaikų protinio atsilikimo tyrimai: 1) apmokymai ir atrankos kriterijų nustatymas, 2) pacientų su protiniu atsilikimu ėminių surinkimas, 3) molekulinė citogenetinė analizė, 4) šeimų su protiniu atsilikimu analizė, 5) genų, susijusių su protiniu atsilikimu, nukleotidų sekos nustatymas, 6) informacijos sklaidimas ir technologinių sprendimų panaudojimas prevencijoje.

INFORMACIJA PACIENTŲ TĖVAMS/TEISIETIEMS ATSTOVAMS IR TIRIAMIESIEMS ASMENIMS, DALYVAUJANTIEMS KONTROLINĖJE GRUPĖJE

Mokslinis apibūdinimas

Visa normaliam žmogaus funkcionavimui reikalinga informacija užrašyta 46 chromosomose. Klaidos chromosomose lemia genetines ligas, įskaitant ir protinį atsilikimą. Daugeliu atvejų protinio atsilikimo genetinės priežastys vis dar lieka neaiškios, tai reiškia, kad dar nežinoma, kuri genetinė klaida lemia ligą. Šio tyrimo tikslas – ištirti ir charakterizuoti tokius vaikų protinio atsilikimo atvejus Rytų Europoje ir Centrinėje Azijoje. Pacientų genetinė medžiaga bus tirama naudojant naujas genetines metodologijas ir aukštas technologijas. Šio tyrimo pagalba galėsime identifikuoti protinį atsilikimą lemiančias genetines klaidas kiekvienam vaikui, identifikuoti kokius simptomus ir kliniškes problemas jos lems ateityje, identifikuoti paveldėjimo ypatumus ir perdavimo iš tėvų vaikams riziką. Tokiu būdu pacientams ir jų šeimoms galėsime pasiūlyti konsultaciją ir kitas genetines paslaugas.

Kadangi kiekviena populiacija turi savų ypatumų, tam, kad būtų galima atskirti, ar genetinis pakitimas lemia sutrikimą, ar yra normos variantas, be pacientų su protiniu atsilikimu, būtina surinkti savanoriškai sutikusių dalyvauti tyrime sveikų žmonių DNR mėginių, kurie bus analizuojami tokiu pat būdu, kaip ir pacientų DNR, naudojant aukštos rezoliucijos mikrovėktorines technologijas.

Dalyviai turėtų savanoriškai pasirašyti (be jokio mūšų ar kitų spaudimo) sutikimo formą. Tais atvejais, kai dalyvauja žmonės su specialiais poreikiais ar negalintys pasirašyti asmenys, arba vaikai iki 18 metų, sutikimo formoje turi būti pasirašyta teisėto atstovo ar globėjo. Atlikus pacientų klinikinį įvertinimą, mes prašysime 10-20 ml kraujo. Kraujo paėmimo procedūrą atliks specializuota slaugytoja. Kraujo ėmimas nėra rizikinga ar komplikacijas sukelianti procedūra. Kai kuriais atvejais galimos vietinės kraujosruvos ar alpuls. Reikalui esant pirmąją pagalbą suteiks gydytojas ir slaugytoja. Iš kraujo mes išskirsime DNR, kuri bus detaliam tirimui naudojant naujas metodologijas ir aukštas technologijas.

Nauda

Šio tyrimo rezultatai bus naudingi žmonėms, dalyvaujantiems programoje, visuomenei ir mokslinei bendruomenei:

- Visiems dalyviams bus pasiūlyti aukštos rezoliucijos genetiniai tyrimai, kurių pagalba tikimasi nustatyti tikslią diagnozę. Netgi jei atlikus tyrimus nebus nustatyta galutinė diagnozė, specifinių ligų lemiančių genetinių pakitimų atmetimas papildys gydytojo supratimą apie paciento būklę ir bus pagrindas tolimesniems vertinimams.
- Šio daugiapakopio tyrimo pagalba apie kai kurių pacientų būklę bus gauta detali informacija ir nustatytos tikslios diagnozės, praskaidrinčios nežinią šeimose.
- Tikimasi, kad nauji duomenys formuos pagrindą genetiniam konsultavimui, kuris bus siūlomas dalyviams bei kitiems pacientams su panašiais sutrikimais. Bus gauta informacija apie paveldėjimą, nešiotojus šeimoje, prognozę ir t.t., kuri užtikrins efektyvesnę sutrikimo kontrolę.
- Mokomosios veiklos dėka programa padės pacientams ir šeimoms geriau suprasti genetinio konsultavimo metu svarstytas problemas.
- Šis tyrimas padės suprasti kokią reikšmę turi genetiniai veiksniai vaikų ir suaugusiųjų protinių sutrikimų pasireiškimui, įskaitant dažnai pasitaikančias problemas, kaip depresija ir psichozė, bei medicininius sutrikimus, kaip epilepsija.

Pavardė:		Vardas:	
Parašas:		Data:	

SUTIKIMO FORMA Dėl dalyvavimo moksliniame tyrime (Dokumentas sudarytas iš 3 puslapių)
Programos, kurioje Jūs kviečiamas dalyvauti, trumpasis pavadinimas
Žmogaus genomo įvairovė, jos kilmė ir fenotipinė realizacija: žmogaus genomo įvairovės ypatumų nulemti ligų patogenezės mechanizmai: vaikų protinio atsilikimo tyrimai: 1) apmokymai ir atrankos kriterijų nustatymas, 2) pacientų su protiniu atsilikimu ėminių surinkimas, 3) molekulinė citogenetinė analizė, 4) šeimų su protiniu atsilikimu analizė, 5) genų, susijusių su protiniu atsilikimu, nukleotidų sekos nustatymas, 6) informacijos sklaidimas ir technologinių sprendimų panaudojimas prevencijoje.

INFORMACIJA PACIENTŲ TĖVAMS/TEISIETIEMS ATSTOVAMS IR TIRIAMIESiems ASMENIMS, DALYVAUJANTIEMS KONTROLINĖJE GRUPĖJE (tėsinys)

- Bus sukurtos naujos specifinės ir finansiškai efektyvios diagnostinės metodikos, išaiškinti nauji taikiniai gydymui vaistais ir patobulintos galimos gydymo strategijos. Tai ne tik pagerins pacientų gyvenimo kokybę, bet ir akivaizdžiai sumažins išlaidas sveikatos priežiūrai.
- Projekto metu bus išaiškinti vaikų protinės negalios biologiniai žymenys, o tai turės teigiamos įtakos ne tik diagnostikoje, bet ir genetiniam konsultavimui bei paciento priežiūrai.
- Medicininuose centruose ir genetikos laboratorijose bus įdiegtos ir naudojamos naujos technologijos mikrovektorių pagrindu. Dėl to ateityje turėsime galimybę atlikti daugiau tyrimų ir iširti daugiau pacientų su panašiais ar kitais sutrikimais.

Kita informacija

- Tais atvejais, kai į šį tyrimą bus įtraukti pacientai su specialiais poreikiais (vidutinis ar sunkus protinis atsilikimas), patys negalintys pasirašyti sutikimo arba apsispręsti dėl dalyvavimo, ar asmenys iki 18 metų amžiaus, sutikimo forma turi būti pasirašyta teisėtų atstovų ar globėjo. Šiais atvejais visuomet reikalingas teisėtų atstovų ar globėjo dalyvavimas, kad būtų palaikomas kontaktas ar priimti sprendimai bei vyktų bet koks kitas bendravimas dėl paciento.
- Šis tyrimas nebuvo atliekamas anksčiau. Tikimasi gauti daug naudingų rezultatų dalyvaujantiems pacientams, taip pat ir medicinai.
- Tyrimas truks 3 metus. Tyrimo metu gauti rezultatai gali būti naudingi šeimoms, todėl jei bus pageidavimas, tyrėjai perduos joms tyrimo rezultatus ir visą informaciją, reikalingą, kad ji būtų aiškiai suprasta, įskaitant galimas pasekmes vaiko sveikatai ir defekto pasikartojimo riziką šeimoje.
- Dalyvaujančios šeimos gali susisiekti su Loreta Cimbalistiene telefonu 852365196 arba elektroniniu paštu loreta.cimbalistiene@santa.lt. Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto kontaktinis tel. 852398700, adresas: Čiurlionio 21/27, Vilnius.
- Genetinę medžiagą ir kitus biologinius mėginius saugos pagrindinis šio projekto tyrėjas. Prie šių mėginių galės prieiti tik projekto pagrindinio tyrėjo mokslinės komandos nariai. Nebus šių biologinių mėginių sklaidimo į jokią kitą laboratoriją. Po kelių metų, pasibaigus programai, mėginiai bus sunaikinti.
- Pacientus konsultuojantis gydytojas pagrindiniam projekto tyrėjui perduos visų pacientų demografinius, asmeninius ir klinišnius duomenis. Šie duomenys bus prienami tik projekto pagrindinio tyrėjo mokslinės komandos nariams. Šie duomenys nebus sklaidžiami į jokią kitą laboratoriją. Po kelių metų, pasibaigus programai, duomenys bus sunaikinti.
- Dalyvaujančius projekte asmenis visais klausimais, susijusiais su jų saugumu ir dalyvavimu mokslinio tyrimo programoje, informuos paciento konsultuojantis gydytojas arba pagrindinis tyrėjas (prof. Vaidutis Kučinskas, tel. 852365057).
- Šiame projekte dalyvaujantys mokslininkai turės teisę publikuoti mokslinio tyrimo programos rezultatus.

Pavardė:		Vardas:	
Parašas:		Data:	

INFORMACINĒ FORMA PACIENTO TĒVAMS/TEISĒTIEMS ATSTOVAMS

BIOMEDICININIO TYRIMO PAVADINIMAS:

Žmogaus genomo įvairovė, jos kilmė ir fenotipinė realizacija: žmogaus genomo įvairovės ypatumų nulemti ligų patogenezės mechanizmai: vaikų protinio atsilikimo tyrimai: 1) apmokymai ir atrankos kriterijų nustatymas; 2) pacientų su protiniu atsilikimu ėminių surinkimas; 3) molekulinė citogenetinė analizė; 4) šeimų su protiniu atsilikimu analizė; 5) genų, susijusių su protiniu atsilikimu, nukleotidų sekos nustatymas; 6) informacijos sklaidimas ir technologinių sprendimų panaudojimas prevencijoje.

PAKVIETIMAS

Jūsų vaikas kviečiamas dalyvauti protinį atsilikimą lemiančių genetinių priežasčių moksliniame projekte. Neskubėdami atidžiai perskaitykite žemiau esančią informaciją, jei norite, aptarkite ją su draugais, giminėmis ar Jūsų šeimos gydytoju.

KODĖL ŠIS TYRIMAS ATLIEKAMAS?

Protinio atsilikimo priežastys yra įvairios ir didelei daliai pacientų lieka nežinomos. Per paskutinius kelis metus buvo įdiegtos naujos technologijos ir nustatyta daug genų, atsakingų už protinį atsilikimą, tačiau keletas tyrimų metodų vis dar neįtraukti į klinikinę praktiką pasauliniu mastu. Bendradarbiaujant su Italija, Estija, Čekija, Lenkija, Ukraina, Kipru, Rusija, Armėnija pacientams bus atliekami šiuolaikiški molekuliniai genetiniai tyrimai. Pagrindinis šio tyrimo tikslas – identifikuoti protinį atsilikimą nulėmusius genetinius defektus, naudojant naujas, pažangias genetines technologijas. Rezultatai gali būti tiesiogiai naudingi Jūsų šeimai, nes tikėtina, kad sužinosite vaiko diagnozę, pasikartojimo riziką ir diagnostikos galimybes kitiems šeimos nariams; be to, tai suteiks visuotinę naudą bendruomenei protinio atsilikimo mokslinio progreso atžvilgiu.

Kadangi protinį atsilikimą lemia labai daug veiksnių, negalime užtikrinti, kad atliktų tyrimų pagalba galėsime nustatyti protinio atsilikimo priežastis visiems pacientams bei visoms šeimoms įvertinti pasikartojimo riziką. Bet netgi „neigiamas“ atsakymas (pakitimų nenustatymas) gali būti svarbus rezultatas, naudingas tolesniems tyrimams ateityje.

KOKIA KAINA?

Tyrimas Jums nekainuos, kadangi jis finansuojamas Europos Komisijos.

KOKIA RIZIKA, SUSIJUSI SU TYRIMU?

Tyrimui reikalingas periferinio kraujo ėminys. Kraujo ėmimo procedūra nėra labai rizikinga ar komplikauta. Kartais susidaro lokali hematoma arba svaigsta galva, tokiu atveju padės slaugytoja ar gydytojas.

AR MES TURIME ALTERNATYVIŲ PASIRINKIMŲ?

Jei nesutiksite dalyvauti tyrime, kraujo ėminiai nebus imami tyrimo tikslais. Bet koku atveju Jūsų sprendimas neturės įtakos standartiniam gydymui ir priežiūrai.

Kita informacija ir kontaktiniai duomenys

Jei abejojate ar nerimaujate dėl dalyvavimo tyrime, ar tiesiog norėtumėte gauti daugiau informacijos, susisieki su gydytoja genetike Loreta Cimbalistiene telefonu 852365196.

Jei nusprendėte dalyvauti tyrime, gausite informacinės formos ir informuoto sutikimo kopijas tam, kad turėtumėte šią informaciją ateityje.

AČIŪ.

II priedas. Klausimynas, skirtas pacientų klinikiniam duomenims rinkti.

Pacientų su protiniu atsilikimu klinikinį duomenų rinkimas

Paciento vardas.....Gimimo data.....
Telefono Nr.
Adresas.....
Tautybė.....
Data:

Siunčiantis gydytojas:.....
Šeimos identifikacinis kodas.....
Paciento identifikacinis kodas.....
Lytis: M/V
Amžius konsultacijos metu:.....

Šeimos anamnezė

Tėvų amžius – mamos gimimo metai:....., tėčio gimimo metai:.....
Tėvų išsilavinimas (mokymasis pagal specialią programą, mokymosi problemos?):.....
Tėvų sveikatos būklės.....
Tėvų giminingumas: T/N (jei Taip, kokio laipsnio):.....
Sergantys* šeimos nariai (pateikti 4 kartų genealogiją).....

* įskaitant kitas būkles, galimai susijusias su protiniu atsilikimu (neurologiniai ar psichiatriniai sutrikimai)

Genealogija:

Nėštumo anamnezė

Vaistų vartojimas: T/N/Nežinoma
Jei taip, patikslinimas:.....
Narkotikų vartojimas: T/N/Nežinoma
Jei taip, patikslinimas:.....
Piktnaudžiavimas alkoholiu: T/N/Nežinoma
Jei taip, patikslinimas:.....
Rūkymas: T/N/Nežinoma
Jei taip, patikslinimas:.....
Nėštumo komplikacijos:

Gimdymas

Gestacinis amžius:.....

Gimimo svoris:.....

Galvos apimtis gimus.....

Įvertinimas pagal Apgar:.....

Įgimti raišos defektai:

Neonatalinės problemos

- Užsitęsusi gelta
- hipotonija
- hipertoniya
- maitinimo problemos
- vėmimas
- traukuliai
- kitos.....

Motorinės raišos atsilikimas: T/N

Pasikartojančios infekcijos: T/N

Objektyvus ištyrimas:

Antropometriniai matavimai:

Ūgis:cm (.....SD)

Svoris:kg (.....SD)

Galvos apimtis:cm (.....SD)

Dismorfiniai požymiai:

Lytiniai organai:.....

Oda ir odos dariniai:.....

Skeleto sistema:.....

Probando kiti neurologiniai ar psichiatriniai sutrikimai:

Traukuliai: T/N, jei Taip, traukulių tipo patikslinimas, EEG pakitimai:.....

Dabartinė protinė būklė:

Protinio atsilikimo laipsnis, IQ testas (amžius, IQ vertinimui naudotas testas):

Elgesio problemos

Oftalmologinis ištyrimas:.....

Audiologinis ištyrimas:.....

Galvos smegenų vaizduojamieji tyrimai:

- UG:.....
- KT:.....
- BMR:.....

Kitos pastabos:

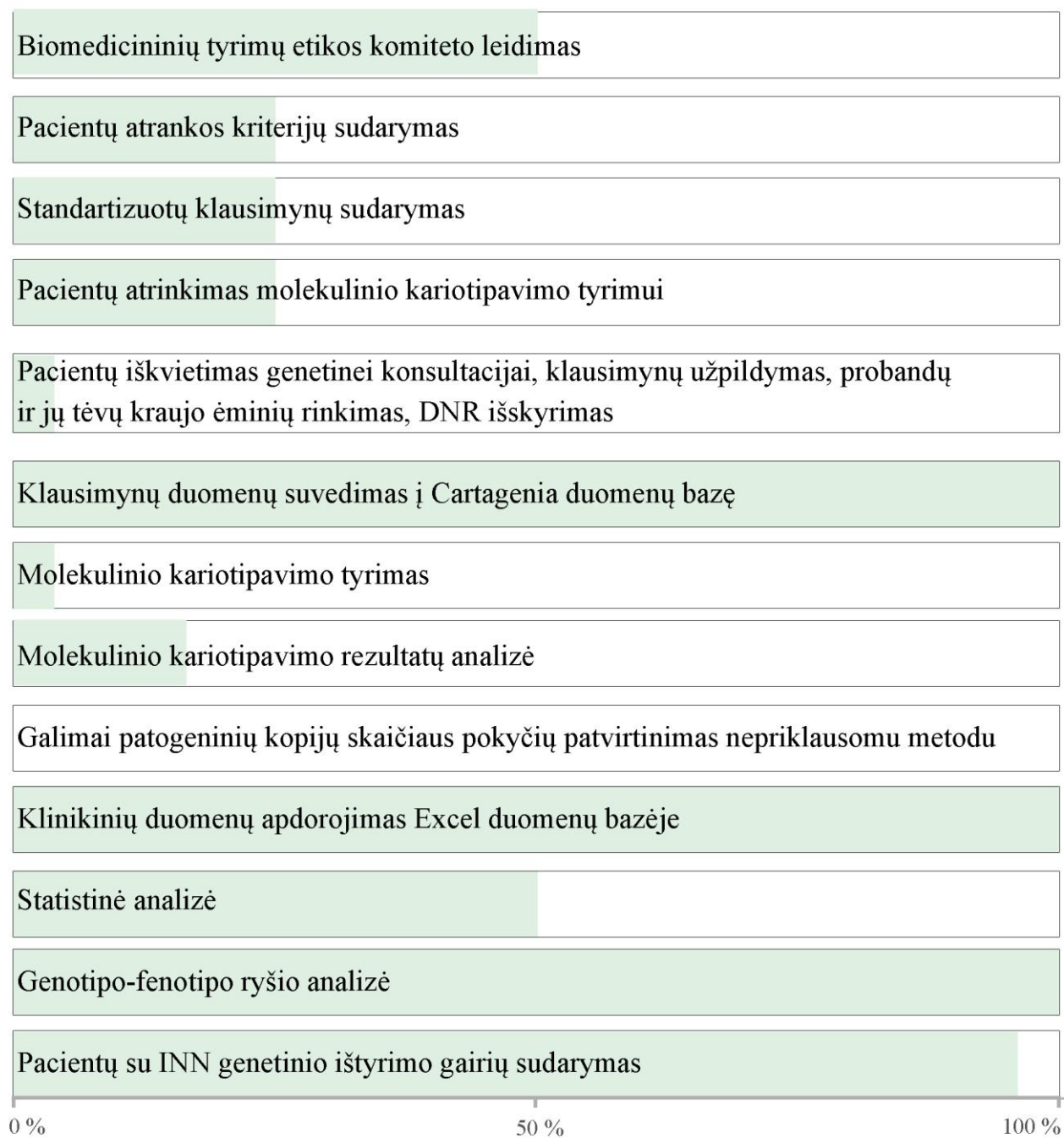
Įtariamas žinomas sindromas?.....

Atlikti tyrimai:

- Kariotipas:.....
- Lūžios X chromosomos sindromo molekulinė analizė.....
- FISH žinomoms mikrodelecijoms/ mikroduplikacijoms.....
- FISH subtelomeriniams persitvarkymams.....
- MLPA subtelomeriniams persitvarkymams.....
- Kiti molekuliniai tyrimai.....
- Aminorūgštys (HPLC).....
- Organinės rūgštys šlapime (GCMS).....
- Lizosominiai fermentai.....
- Pieno rūgštis.....
- Kreatino defektas (kreatino/kreatinino santykis šlapime).....
- Kiti:.....

Gydytojo parašas:

III priedas. Darbo vykdymo etapai (autorės indėlio dalis pažymėta žalia spalva)



NAUDOTOS LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Luckasson R, Reeve A. Naming, defining, and classifying in mental retardation. *Ment Retard*. 2001; 39:47-52.
2. Leonard H, Wen X. The epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millennium. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2002; 8:117-134.
3. Ropers HH. Genetics of early onset cognitive impairment. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2010; 11:161-187.
4. Ropers HH. Genetics of intellectual disability. *Curr Opin Genet Dev*. 2008; 18:241-250.
5. Curry CJ, Stevenson RE, Aughton D, Byrne J, Carey JC, Cassidy S, Cunniff C, Graham JM, Jr Jones MC, Kaback MM et al. Evaluation of mental retardation: recommendations of a Consensus Conference: American College of Medical Genetics. *Am J Med Genet*. 1997; 72:468-477.
6. Rauch A, Hoyer J, Guth S, Zweier C, Kraus C, Becker C, Zenker M, Huffmeier U, Thiel C, Ruschendorf F et al. Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am J Med Genet A*. 2006; 140:2063-2074.
7. Pfundt R, Veltman JA. Structural genomic variation in intellectual disability. *Methods Mol Biol*. 2012; 838:77-95.
8. Shaffer LG, Bejjani BA, Torchia B, Kirkpatrick S, Coppinger J, Ballif BC. The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities: cytogenetic methods of the past, new technologies for the future. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2007; 145C:335-345.
9. Shevell MI, Bejjani BA, Srour M, Rorem EA, Hall N, Shaffer LG. Array comparative genomic hybridization in global developmental delay. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2008; 147B:1101-1108.
10. Li MM, Andersson HC. Clinical application of microarray-based molecular cytogenetics: an emerging new era of genomic medicine. *J Pediatr*. 2009; 155:311-317.

11. Schuurs-Hoeijmakers JH, Hehir-Kwa JY, Pfundt R, van Bon BW, de Leeuw N, Kleefstra T, Willemsen MA, van Kessel AG, Brunner HG, Veltman JA et al. Homozygosity mapping in outbred families with mental retardation. *Eur J Hum Genet.* 2011; 19:597-601.
12. Galasso C, Lo-Castro A, El-Malhany N, Curatolo P. "Idiopathic" mental retardation and new chromosomal abnormalities. *Ital J Pediatr.* 2010; 36:17.
13. Vermeesch JR, Fiegler H, de Leeuw N, Szuhai K, Schoumans J, Ciccone R, Speleman F, Rauch A, Clayton-Smith J, Van Ravenswaaij C et al. Guidelines for molecular karyotyping in constitutional genetic diagnosis. *Eur J Hum Genet.* 2007; 15:1105-1114.
14. Stankiewicz P, Beaudet AL. Use of array CGH in the evaluation of dysmorphology, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation. *Curr Opin Genet Dev.* 2007; 17:182-192.
15. Sagoo GS, Butterworth AS, Sanderson S, Shaw-Smith C, Higgins JP, Burton H. Array CGH in patients with learning disability (mental retardation) and congenital anomalies: updated systematic review and meta-analysis of 19 studies and 13,926 subjects. *Genet Med.* 2009; 11:139-146.
16. Tjio JH. The chromosome number of man. *Am J Obstet Gynecol.* 1978; 130:723-724.
17. Lejeune J, Turpin R, Gautier M. Mongolism; a chromosomal disease (trisomy). *Bull Acad Natl Med.* 1959; 143:256-265.
18. Patau K, Smith DW, Therman E, Inhorn SL, Wagner HP. Multiple congenital anomaly caused by an extra autosome. *Lancet.* 1960; 1:790-793.
19. Edwards JH, Harnden DG, Cameron AH, Crosse VM, Wolff OH. A new trisomic syndrome. *Lancet.* 1960; 1:787-790.
20. Lejeune J, Lafourcade J, Berger R, Vialatte J, Boeswillwald M, Seringe P, Turpin R. 3 Cases of Partial Deletion of the Short Arm of a 5 Chromosome. *C R Hebd Seances Acad Sci.* 1963; 257:3098-3102.
21. Kučinskias V, Sadauskas J, Usonytė J. „Katės kniaukimo“ (Cri du chat) sindromas: 46,XX,Bp-. *Sveikatos apsauga.* 1973; 7:28-31.

22. Caspersson T, Zech L, Johansson C, Modest EJ. Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents. *Chromosoma*. 1970; 30:215-227.
23. Seabright M. Human chromosome banding. *Lancet*. 1972; 1:967.
24. Bejjani BA, Shaffer LG. Clinical utility of contemporary molecular cytogenetics. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2008; 9:71-86.
25. Ballif BC, Sulpizio SG, Lloyd RM, Minier SL, Theisen A, Bejjani BA, Shaffer LG. The clinical utility of enhanced subtelomeric coverage in array CGH. *Am J Med Genet A*. 2007; 143A:1850-1857.
26. Knight SJ, Regan R, Nicod A, Horsley SW, Kearney L, Homfray T, Winter RM, Bolton P, Flint J. Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet*. 1999; 354:1676-1681.
27. Lu X, Shaw CA, Patel A, Li J, Cooper ML, Wells WR, Sullivan CM, Sahoo T, Yatsenko SA, Bacino CA et al. Clinical implementation of chromosomal microarray analysis: summary of 2513 postnatal cases. *PLoS One*. 2007; 2:e327.
28. Shaffer LG, Kashork CD, Saleki R, Rorem E, Sundin K, Ballif BC, Bejjani BA. Targeted genomic microarray analysis for identification of chromosome abnormalities in 1500 consecutive clinical cases. *J Pediatr*. 2006; 149:98-102.
29. Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet*. 2004; 36:949-951.
30. Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Maner S, Massa H, Walker M, Chi M et al. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science*. 2004; 305:525-528.
31. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature*. 2006; 444:444-454.
32. Conrad DF, Pinto D, Redon R, Feuk L, Gokcumen O, Zhang Y, Aerts J, Andrews TD, Barnes C, Campbell P et al. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature*. 2010; 464:704-712.

33. Gu W, Zhang F, Lupski JR. Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics*. 2008; 1:4.
34. Stankiewicz P, Lupski JR. Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annu Rev Med*. 2010; 61:437-455.
35. Cody JD, Hale DE. Linking chromosome abnormality and copy number variation. *Am J Med Genet A*. 2011; 155A:469-475.
36. Lupski JR. Structural variation in the human genome. *N Engl J Med*. 2007; 356:1169-1171.
37. Lee C, Iafrate AJ, Brothman AR. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nat Genet*. 2007; 39:S48-54.
38. Rosenberg C, Knijnenburg J, Bakker E, Vianna-Morgante AM, Sloos W, Otto PA, Kriek M, Hansson K, Krepischi-Santos AC, Fiegler H et al. Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: clinical significance of imbalances present both in affected children and normal parents. *J Med Genet*. 2006; 43:180-186.
39. Girirajan S, Vlangos CN, Szomju BB, Edelman E, Trevors CD, Dupuis L, Nezarati M, Bunyan DJ, Elsea SH. Genotype-phenotype correlation in Smith-Magenis syndrome: evidence that multiple genes in 17p11.2 contribute to the clinical spectrum. *Genet Med*. 2006; 8:417-427.
40. de Vries BB, Pfundt R, Leisink M, Koolen DA, Vissers LE, Janssen IM, Reijmersdal S, Nillesen WM, Huys EH, Leeuw N et al. Diagnostic genome profiling in mental retardation. *Am J Hum Genet*. 2005; 77:606-616.
41. Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, Troge J, Lese-Martin C, Walsh T, Yamrom B, Yoon S, Krasnitz A, Kendall J et al. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science*. 2007; 316:445-449.
42. Walsh T, McClellan JM, McCarthy SE, Addington AM, Pierce SB, Cooper GM, Nord AS, Kusenda M, Malhotra D, Bhandari A et al. Rare structural variants disrupt multiple genes in neurodevelopmental pathways in schizophrenia. *Science*. 2008; 320:539-543.

43. Liang JS, Shimojima K, Yamamoto T. Application of array-based comparative genome hybridization in children with developmental delay or mental retardation. *Pediatr Neonatol.* 2008; 49:213-217.
44. Freimer N, Sabatti, C. The human phenome project. *Nat Genet.*2003; 34:15-21.
45. Schinzel A. Karyotype-phenotype correlations in autosomal chromosomal aberrations. *Prog Clin Biol Res.* 1993; 384:19-31.
46. Southard AE, Edelmann LJ, Gelb BD. Role of copy number variants in structural birth defects. *Pediatrics.* 2012; 129:755-763.
47. Weatherall D. 2003 William Allan Award address. The Thalassemias: the role of molecular genetics in an evolving global health problem. *Am J Hum Genet.* 2004; 74:385-392.
48. Firth HV, Richards SM, Bevan AP, Clayton S, Corpas M, Rajan D, Van Vooren S, Moreau Y, Pettett RM, Carter NP. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. *Am J Hum Genet.* 2009; 84:524-533.
49. Swaminathan GJ, Bragin E, Chatzimichali EA, Corpas M, Bevan AP, Wright CF, Carter NP, Hurles ME, Firth HV. DECIPHER: web-based, community resource for clinical interpretation of rare variants in developmental disorders. *Hum Mol Genet.* 2012; 21:R37-44.
50. Kaminsky EB, Kaul V, Paschall J, Church DM, Bunke B, Kunig D, Moreno-De-Luca D, Moreno-De-Luca A, Mulle JG, Warren S et al. An evidence-based approach to establish the functional and clinical significance of copy number variants in intellectual and developmental disabilities. *Genet Med.* 2011; 13:777-784.
51. Feenstra I, Fang J, Koolen DA, Siezen A, Evans C, Winter RM, Lees MM, Riegel M, de Vries BB, Van Ravenswaaij CM et al. European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations (ECARUCA); an online database for rare chromosome abnormalities. *Eur J Med Genet.* 2006; 49:279-291.

52. Vissers LE, de Vries BB, Veltman JA. Genomic microarrays in mental retardation: from copy number variation to gene, from research to diagnosis. *J Med Genet.* 2010; 47:289-297.
53. Shaffer LG, Theisen A, Bejjani BA, Ballif BC, Aylsworth AS, Lim C, McDonald M, Ellison JW, Kostiner D, Saitta S et al. The discovery of microdeletion syndromes in the post-genomic era: review of the methodology and characterization of a new 1q41q42 microdeletion syndrome. *Genet Med.* 2007; 9:607-616.
54. Vissers LE, van Ravenswaaij CM, Admiraal R, Hurst JA, de Vries BB, Janssen IM, van der Vliet WA, Huys EH, de Jong PJ, Hamel BC et al. Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. *Nat Genet.* 2004; 36:955-957.
55. Poot M, Hochstenbach R. A three-step workflow procedure for the interpretation of array-based comparative genome hybridization results in patients with idiopathic mental retardation and congenital anomalies. *Genet Med.* 2010; 12:478-485.
56. Vissers LE, Veltman JA, van Kessel AG, Brunner HG. Identification of disease genes by whole genome CGH arrays. *Hum Mol Genet.* 2005; 14 Spec No. 2:R215-223.
57. Mikhail FM, Lose EJ, Robin NH, Descartes MD, Rutledge KD, Rutledge SL, Korf BR, Carroll AJ. Clinically relevant single gene or intragenic deletions encompassing critical neurodevelopmental genes in patients with developmental delay, mental retardation, and/or autism spectrum disorders. *Am J Med Genet A.* 2011; 155A:2386-2396.
58. Ramocki MB, Zoghbi HY. Failure of neuronal homeostasis results in common neuropsychiatric phenotypes. *Nature.* 2008; 455:912-918.
59. Guilmatre A, Dubourg C, Mosca AL, Legallic S, Goldenberg A, Drouin-Garraud V, Layet V, Rosier A, Briault S, Bonnet-Brilhault F et al. Recurrent rearrangements in synaptic and neurodevelopmental genes and shared biologic pathways in schizophrenia, autism, and mental retardation. *Arch Gen Psychiatry.* 2009; 66:947-956.

60. Tarpey PS, Smith R, Pleasance E, Whibley A, Edkins S, Hardy C, O'Meara S, Latimer C, Dicks E, Menzies A et al. A systematic, large-scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation. *Nat Genet.* 2009; 41:535-543.
61. Kasnauskiene J, Cimbalistiene L, Ciuladaite Z, Preiksaitiene E, Kucinskiene ZA, Hettinger JA, Sismani C, Patsalis PC, Kucinskas V. De novo 5q35.5 duplication with clinical presentation of Sotos syndrome. *Am J Med Genet A.* 2011; 155A:2501-2507.
62. Ciuladaite Z, Kasnauskiene J, Cimbalistiene L, Preiksaitiene E, Patsalis PC, Kucinskas V. Mental retardation and autism associated with recurrent 16p11.2 microdeletion: incomplete penetrance and variable expressivity. *J Appl Genet.* 2011; 52:443-449.
63. Kasnauskiene J, Cimbalistiene L, Utkus A, Ciuladaite Z, Preiksaitiene E, Peciulyte A, Kucinskas V. Two New de novo Interstitial Duplications Covering 2p14-p22.1: Clinical and Molecular Analysis. *Cytogenet Genome Res.* 2013; 139(1):52-8.
64. Backx L, Ceulemans B, Vermeesch JR, Devriendt K, Van Esch H. Early myoclonic encephalopathy caused by a disruption of the neuregulin-1 receptor ErbB4. *Eur J Hum Genet.* 2009; 17:378-382.
65. Magri C, Piovani G, Pilotta A, Michele T, Buzi F, Barlati S. De novo deletion of chromosome 2q24.2 region in a mentally retarded boy with muscular hypotonia. *Eur J Med Genet.* 2011; 54:361-364.
66. Krepischi AC, Knijnenburg J, Bertola DR, Kim CA, Pearson PL, Bijlsma E, Szuhai K, Kok F, Vianna-Morgante AM, Rosenberg C. Two distinct regions in 2q24.2-q24.3 associated with idiopathic epilepsy. *Epilepsia.* 2010; 51:2457-2460.
67. Kasnauskiene J, Ciuladaite Z, Preiksaitiene E, Matuleviciene A, Alexandrou A, Koumbaris G, Sismani C, Pepalyte I, Patsalis PC, Kucinskas V. A single gene deletion on 4q28.3: PCDH18--a new candidate gene for intellectual disability? *Eur J Med Genet.* 2012; 55:274-277.

68. Bonnet C, Andrieux J, Beri-Dexheimer M, Leheup B, Boute O, Manouvrier S, Delobel B, Copin H, Receveur A, Mathieu M et al. Microdeletion at chromosome 4q21 defines a new emerging syndrome with marked growth restriction, mental retardation and absent or severely delayed speech. *J Med Genet.* 2010; 47:377-384.
69. Chui JV, Weisfeld-Adams JD, Tepperberg J, Mehta L. Clinical and molecular characterization of chromosome 7p22.1 microduplication detected by array CGH. *Am J Med Genet A.* 2011; 155A:2508-2511.
70. Preiksaitiene E, Kasnauskiene J, Ciuladaite Z, Tumiene B, Patsalis PC, Kucinskas V. Clinical and molecular characterization of a second case of 7p22.1 microduplication. *Am J Med Genet A.* 2012; 158A:1200-1203.
71. Poot M, Beyer V, Schwaab I, Damatova N, Van't Slot R, Prothero J, Holder SE, Haaf T. Disruption of CNTNAP2 and additional structural genome changes in a boy with speech delay and autism spectrum disorder. *Neurogenetics.* 2010; 11:81-89.
72. Preiksaitiene E, Mannik K, Dirse V, Utkus A, Ciuladaite Z, Kasnauskiene J, Kurg A, Kucinskas V. A novel de novo 1.8 Mb microdeletion of 17q21.33 associated with intellectual disability and dysmorphic features. *Eur J Med Genet.* 2012; 55:656-659.
73. de Vries BB, White SM, Knight SJ, Regan R, Homfray T, Young ID, Super M, McKeown C, Splitt M, Quarrell OW et al. Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist. *J Med Genet;* 2001; 38:145-150.
74. Hochstenbach R, Buizer-Voskamp JE, Vorstman JA, Ophoff RA. Genome arrays for the detection of copy number variations in idiopathic mental retardation, idiopathic generalized epilepsy and neuropsychiatric disorders: lessons for diagnostic workflow and research. *Cytogenet Genome Res.* 2011; 135:174-202.
75. de Vries BB, van den Ouweland AM, Mohkamsing S, Duivenvoorden HJ, Mol E, Gelsema K, van Rijn M, Halley DJ, Sandkuijl LA, Oostra B.A et al. Screening and diagnosis for the fragile X syndrome among the mentally

- retarded: an epidemiological and psychological survey. Collaborative Fragile X Study Group. *Am J Hum Genet.* 2007; 61:660-667.
76. Stevenson RE, Massey PS, Schroer RJ, McDermott S, Richter B. Preventable fraction of mental retardation: analysis based on individuals with severe mental retardation. *Ment Retard.* 1996; 34:182-188.
77. Shoukier M, Klein N, Auber B, Wickert J, Schroder J, Zoll B, Burfeind P, Bartels I, Alsat E, Lingen M et al. Array CGH in patients with developmental delay or intellectual disability: are there phenotypic clues to pathogenic copy number variants? *Clin Genet.* 2013 Jan;83(1):53-65.
78. Jin J, Cardozo T, Lovering RC, Elledge SJ, Pagano M, Harper JW. Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins. *Genes Dev.* 2004; 18:2573-2580.
79. Karakozova M, Kozak M, Wong CC, Bailey AO, Yates JR, 3rd Mogilner A, Zebroski H, Kashina A. Arginylation of beta-actin regulates actin cytoskeleton and cell motility. *Science.* 2006; 313:192-196.
80. Mosialos G, Birkenbach M, Ayehunie S, Matsumura F, Pinkus GS, Kieff E, Langhoff E. Circulating human dendritic cells differentially express high levels of a 55-kd actin-bundling protein. *Am J Pathol.* 1996; 148:593-600.
81. Chen D, Li X, Zhai Z, Shu HB. A novel zinc finger protein interacts with receptor-interacting protein (RIP) and inhibits tumor necrosis factor (TNF)- and IL1-induced NF-kappa B activation. *J Biol Chem.* 2002; 277:15985-15991.
82. Ritzler JM, Sawhney R, Geurts van Kessel AH, Grzeschik KH, Schinzel A, Berchtold MW. The genes for the highly homologous Ca(2+)-binding proteins oncomodulin and parvalbumin are not linked in the human genome. *Genomics.* 1992; 12:567-572.
83. Kadyrov FA, Dzantiev L, Constantin N, Modrich P. Endonucleolytic function of MutLalpha in human mismatch repair. *Cell.* 2006; 126:297-308.
84. Vaughn CP, Robles J, Swensen JJ, Miller CE, Lyon E, Mao R, Bayraktordemir P, Samowitz WS. Clinical analysis of PMS2: mutation detection and avoidance of pseudogenes. *Hum Mutat.* 2010; 31:588-593.

85. Quevillon S, Robinson JC, Berthonneau E, Siatecka M, Mirande M. Macromolecular assemblage of aminoacyl-tRNA synthetases: identification of protein-protein interactions and characterization of a core protein. *J Mol Biol.* 2010; 285:183-195.
86. Corti O, Hampe C, Koutnikova H, Darios F, Jacquier S, Prigent A, Robinson JC, Pradier L, Ruberg M, Mirande M et al. The p38 subunit of the aminoacyl-tRNA synthetase complex is a Parkin substrate: linking protein biosynthesis and neurodegeneration. *Hum Mol Genet.* 2003; 12:1427-1437.
87. Hwang SY, Kim MK, Kim JC. Cloning of hHRI, human heme-regulated eukaryotic initiation factor 2 α kinase: down-regulated in epithelial ovarian cancers. *Mol Cells.* 2000; 10:584-591.
88. Franco M, Boretto J, Robineau S, Monier S, Goud B, Chardin P, Chavrier P. ARNO3, a Sec7-domain guanine nucleotide exchange factor for ADP ribosylation factor 1, is involved in the control of Golgi structure and function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95:9926-9931.
89. Berg JS, Potocki L, Bacino CA. Common recurrent microduplication syndromes: diagnosis and management in clinical practice. *Am J Med Genet A.* 2010; 152A:1066-1078.
90. Cai T, Yu P, Tagle DA, Xia J. Duplication of 7p21.2-->pter due to maternal 7p;21q translocation: implications for critical segment assignment in the 7p duplication syndrome. *Am J Med Genet.* 1999; 86:305-311.
91. Kozma C, Haddad BR, Meck JM. Trisomy 7p resulting from 7p15;9p24 translocation: report of a new case and review of associated medical complications. *Am J Med Genet.* 2000; 91:286-290.
92. Papadopoulou E, Sifakis S, Sarri C, Gyftodimou J, Liehr T, Mrasek K, Kalmanti M, Petersen MB. A report of pure 7p duplication syndrome and review of the literature. *Am J Med Genet A.* 2006; 140:2802-2806.
93. Reish O, Berry SA, Dewald G, King, RA. Duplication of 7p: further delineation of the phenotype and restriction of the critical region to the distal part of the short arm. *Am J Med Genet.* 1996; 61:21-25.

94. Franz HB, Schliephacke M, Niemann G, Mielke G, Backsch C. De novo direct tandem duplication of a small segment of the short arm of chromosome 7 (p21.22-->22.1). *Clin Genet.* 1996; 50:426-429.
95. Megarbane A, Le Lorc HM, Elghezal H, Joly G, Gosset P, Souraty N, Samaras L, Prieur M, Vekemans M, Turleau C et al. Pure partial 7p trisomy including the TWIST, HOXA, and GLI3 genes. *J Med Genet.* 2001; 38:178-182.
96. Zahed L, Pramparo T, Farra C, Mikati M, Zuffardi O. A patient with duplication (7)(p22.1pter) characterized by array-CGH. *Am J Med Genet A.* 2007; 143:168-171.
97. Bunnell TM, Burbach BJ, Shimizu Y, Ervasti JM. beta-Actin specifically controls cell growth, migration, and the G-actin pool. *Mol Biol Cell.* 2011; 22:4047-4058.
98. Peckham M, Miller G, Wells C, Zicha D, Dunn GA. Specific changes to the mechanism of cell locomotion induced by overexpression of beta-actin. *J Cell Sci.* 2001; 114:1367-1377.
99. Cejudo-Martin P, Courtneidge SA. Podosomal proteins as causes of human syndromes: a role in craniofacial development? *Genesis.* 2011; 49:209-221.
100. Leana-Cox J, Levin S, Surana R, Wulfsberg E, Keene CL, Raffel LJ, Sullivan B, Schwartz S. Characterization of de novo duplications in eight patients by using fluorescence in situ hybridization with chromosome-specific DNA libraries. *Am J Hum Genet.* 1993; 52:1067-1073.
101. Zahir FR, Langlois S, Gall K, Eydoux P, Marra MA, Friedman JM. A novel de novo 1.1 Mb duplication of 17q21.33 associated with cognitive impairment and other anomalies. *Am J Med Genet A.* 2009; 149A:1257-1262.
102. Krey JF, Dolmetsch RE. Molecular mechanisms of autism: a possible role for Ca²⁺ signaling. *Curr Opin Neurobiol.* 2007; 17:112-119.
103. Strom SP, Stone JL, Ten Bosch JR, Merriman B, Cantor RM, Geschwind DH, Nelson SF. High-density SNP association study of the 17q21 chromosomal region linked to autism identifies CACNA1G as a novel candidate gene. *Mol Psychiatry.* 2010; 15:996-1005.

104. Singh B, Monteil A, Bidaud I, Sugimoto Y, Suzuki T, Hamano S, Oguni H, Osawa M, Alonso ME, Delgado-Escueta AV et al. Mutational analysis of CACNA1G in idiopathic generalized epilepsy. *Mutation in brief #962*. Online. *Hum Mutat.* 2007; 28:524-525.
105. Aspatwar A, Tolvanen ME, Parkkila S. Phylogeny and expression of carbonic anhydrase-related proteins. *BMC Mol Biol.* 2010; 11:25.
106. Okamoto N, Fujikawa-Adachi K, Nishimori I, Taniuchi K, Onishi S. cDNA sequence of human carbonic anhydrase-related protein, CA-RP X: mRNA expressions of CA-RP X and XI in human brain. *Biochim Biophys Acta.* 2001; 1518:311-316.
107. Shen Z, Gantcheva S, Mansson B, Heinegard D, Sommarin Y. Chondroadherin expression changes in skeletal development. *Biochem J.* 1998; 330 (Pt 1):549-557.
108. Tasheva ES, Ke A, Conrad GW. Analysis of the expression of chondroadherin in mouse ocular and non-ocular tissues. *Mol Vis.* 2004; 10:544-554.
109. Rio C, Rieff HI, Qi P, Khurana TS, Corfas G. Neuregulin and erbB receptors play a critical role in neuronal migration. *Neuron.* 1997; 19:39-50.
110. Li B, Woo RS, Mei L, Malinow R. The neuregulin-1 receptor erbB4 controls glutamatergic synapse maturation and plasticity. *Neuron.* 2007; 54:583-597.
111. Woo RS, Li XM, Tao Y, Carpenter-Hyland E, Huang YZ, Weber J, Neiswender H, Dong XP, Wu J, Gassmann M et al. Neuregulin-1 enhances depolarization-induced GABA release. *Neuron.* 2007; 54:599-610.
112. Nicodemus KK, Law AJ, Radulescu E, Luna A, Kolachana B, Vakkalanka R, Rujescu D, Giegling I, Straub RE, McGee K et al. Biological validation of increased schizophrenia risk with NRG1, ERBB4, and AKT1 epistasis via functional neuroimaging in healthy controls. *Arch Gen Psychiatry.* 2010; 67:991-1001.
113. Neddens J, Fish KN, Tricoire L, Vullhorst D, Shamir A, Chung W, Lewis DA, McBain CJ, Buonanno A. Conserved interneuron-specific ErbB4 expression in frontal cortex of rodents, monkeys, and humans: implications for schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 2011; 70:636-645.

114. Stefansson H, Sigurdsson E, Steinthorsdottir V, Bjornsdottir S, Sigmundsson T, Ghosh S, Brynjolfsson J, Gunnarsdottir S, Ivarsson O, Chou TT et al. Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *Am J Hum Genet.* 2002; 71:877-892.
115. Tan GH, Liu YY, Hu XL, Yin DM, Mei L, Xiong ZQ. Neuregulin 1 represses limbic epileptogenesis through ErbB4 in parvalbumin-expressing interneurons. *Nat Neurosci.* 2012; 15:258-266.
116. Franco LM, de Ravel T, Graham BH, Frenkel SM, Van Driessche J, Stankiewicz P, Lupski JR, Vermeesch JR, Cheung SW. A syndrome of short stature, microcephaly and speech delay is associated with duplications reciprocal to the common Sotos syndrome deletion. *Eur J Hum Genet.* 2010; 18:258-261.
117. Kirchhoff M, Bisgaard AM, Bryndorf T, Gerdes T. MLPA analysis for a panel of syndromes with mental retardation reveals imbalances in 5.8% of patients with mental retardation and dysmorphic features, including duplications of the Sotos syndrome and Williams-Beuren syndrome regions. *Eur J Med Genet.* 2007; 50:33-42.
118. Chen CP, Lin SP, Lin CC, Chen YJ, Chern SR, Li YC, Hsieh LJ, Lee CC, Pan CW, Wang W. Molecular cytogenetic analysis of de novo dup(5)(q35.2q35.3) and review of the literature of pure partial trisomy 5q. *Am J Med Genet A.* 2006; 140:1594-1600.
119. Kurotaki N, Harada N, Yoshiura K, Sugano S, Niikawa N, Matsumoto N. Molecular characterization of NSD1, a human homologue of the mouse Nsd1 gene. *Gene.* 2001; 279:197-204.
120. Rayasam GV, Wendling O, Angrand PO, Mark M, Niederreither K, Song L, Lerouge T, Hager GL, Chambon P, Losson R. NSD1 is essential for early post-implantation development and has a catalytically active SET domain. *EMBO J.* 2003; 22:3153-3163.
121. Gijbbers AC, Lew JY, Bosch CA, Schuurs-Hoeijmakers JH, van Haeringen A, den Hollander NS, Kant SG, Bijlsma EK, Breuning MH, Bakker E et al. A new diagnostic workflow for patients with mental retardation and/or multiple

- congenital abnormalities: test arrays first. *Eur J Hum Genet.* 2009; 17:1394-1402.
122. Hochstenbach R, van Binsbergen E, Engelen J, Nieuwint A, Polstra A, Poddighe P, Ruivenkamp C, Sikkema-Raddatz B, Smeets D, Poot M. Array analysis and karyotyping: workflow consequences based on a retrospective study of 36,325 patients with idiopathic developmental delay in the Netherlands. *Eur J Med Genet.* 2009; 52:161-169.
123. Zhang X, Sniijders A, Segraves R, Niebuhr A, Albertson D, Yang H, Gray J, Niebuhr E, Bolund L, Pinkel D. High-resolution mapping of genotype-phenotype relationships in cri du chat syndrome using array comparative genomic hybridization. *Am J Hum Genet.* 2005; 76:312-326.
124. Gersh M, Goodart SA, Pasztor LM, Harris DJ, Weiss L, Overhauser J. Evidence for a distinct region causing a cat-like cry in patients with 5p deletions. *Am J Hum Genet.* 1995; 56:1404-1410.
125. Overhauser J, Huang X, Gersh M, Wilson W, McMahon J, Bengtsson U, Rojas K, Meyer M, Wasmuth JJ. Molecular and phenotypic mapping of the short arm of chromosome 5: sublocalization of the critical region for the cri-du-chat syndrome. *Hum Mol Genet.* 1994; 3:247-252.
126. Mainardi PC, Perfumo C, Cali A, Coucourde G, Pastore G, Cavani S, Zara F, Overhauser J, Pierluigi M, Bricarelli FD. Clinical and molecular characterisation of 80 patients with 5p deletion: genotype-phenotype correlation. *J Med Genet.* 2001; 38:151-158.
127. Warburton D. De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. *Am J Hum Genet.* 1991; 49:995-1013.
128. Patsalis PC. Complex chromosomal rearrangements. *Genet Couns.* 2007; 18:57-69.
129. Baker K, Raymond FL, Bass N. Genetic investigation for adults with intellectual disability: opportunities and challenges. *Curr Opin Neurol.* 2012; 25:150-158.

130. Basel-Vanagaite L. Clinical approaches to genetic mental retardation. *Isr Med Assoc J.* 2008; 10:821-826.
131. Michelson, D.J., Shevell, M.I., Sherr, E.H., Moeschler, J.B., Gropman, A.L., and Ashwal, S. 2011. Evidence report: Genetic and metabolic testing on children with global developmental delay: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology.* 2009; 77:1629-1635.
132. Verloes A, Heron D, Billette de Villemeur T, Afenjar A, Baumann C, Bahi-Buisson N, Charles P, Faudet A, Jacquette A, Mignot C et al. Diagnostic investigations for an unexplained developmental disability. *Arch Pediatr.* 2012; 19:194-207.
133. Battaglia A, Bianchini E, Carey JC. Diagnostic yield of the comprehensive assessment of developmental delay/mental retardation in an institute of child neuropsychiatry. *Am J Med Genet.* 1999; 82:60-66.
134. Majnemer A, Shevell MI. Diagnostic yield of the neurologic assessment of the developmentally delayed child. *J Pediatr.* 1995; 127:193-199.
135. Shevell M, Ashwal S, Donley D, Flint J, Gingold M, Hirtz D, Majnemer A, Noetzel M, Sheth RD et al. Practice parameter: evaluation of the child with global developmental delay: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and The Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology.* 2003; 60:367-380.
136. Macayran JF, Cederbaum SD, Fox MA. Diagnostic yield of chromosome analysis in patients with developmental delay or mental retardation who are otherwise nondysmorphic. *Am J Med Genet A.* 2006; 140:2320-2323.
137. Vissers LE, de Vries BB, Osoegawa K, Janssen IM, Feuth T, Choy CO, Straatman H, van der Vliet W, Huys EH, van Rijk A et al. Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Am J Hum Genet.* 2003; 73:1261-1270.

138. Edelman L, Hirschhorn K. Clinical utility of array CGH for the detection of chromosomal imbalances associated with mental retardation and multiple congenital anomalies. *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1151:157-166.
139. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet.* 2010; 86:749-764.
140. Trakadis Y, Shevell M. Microarray as a first genetic test in global developmental delay: a cost-effectiveness analysis. *Dev Med Child Neurol.* 2011; 53:994-999.
141. Stevenson RE. Splitting and lumping in the nosology of XLMR. *Am J Med Genet.* 2000; 97:174-182.
142. Papavasiliou AS, Bazigou H, Paraskevoulakos E, Kotsalis C. Neurometabolic testing in developmental delay. *J Child Neurol.* 2000; 15:620-622.
143. Ku CS, Naidoo N, Pawitan Y. Revisiting Mendelian disorders through exome sequencing. *Hum Genet.* 2011; 129:351-370.
144. Kuhlenbaumer G, Hullmann J, Appenzeller S. Novel genomic techniques open new avenues in the analysis of monogenic disorders. *Hum Mutat.* 2011. 32:144-151.

CURRICULUM VITAE

VARDAS, PAVARDĖ	Eglė Preikšaitienė (Zarakauskaitė)
NAMŲ ADRESAS	Santariškių 31A-3, Vilnius
TEL. NR.	8 65915103
EL. PAŠTAS	eglepreiksaitiene@gmail.com
DARBO ADRESAS	Santariškių g. 2, Vilnius
GIMIMO DATA, VIETA	1980 02 03, Pakruojis
IŠSILAVINIMAS:	
2011–2013	Vilniaus universitetas, Žmogaus ir medicininės genetikos katedra. Doktorantūra; Medicina B06 mokslo kryptis.
2005–2011	Vilniaus universitetas, Žmogaus ir medicininės genetikos katedra. Genetikos rezidentūra. Suteikta gydytojo genetiko kvalifikacija.
2004–2005 m.	Medicinos internatūros studijos.
1998–2004 m.	Vilniaus universitetas, Medicinos fakultetas, gydomosios medicinos specialybė.
1986–1998 m.	Pakruojo „Atžalyno“ vidurinė mokykla.
DARBO PATIRTIS:	
2012 09 01–	Vilniaus universitetas, Žmogaus ir medicininės genetikos katedra; asistentė.
2011 09 01–	VUL SK, Medicininės genetikos centras; gydytojas genetikas
2008–2011	VUL SK, Medicininės genetikos centras; gydytojas rezidentas.
2006–	Vilniaus universitetas, Žmogaus ir medicininės genetikos katedra; jaunesnioji mokslo darbuotoja.
2005–2007	Valstybinė vaistų kontrolės tarnyba prie SAM, vaistų registracijos departamentas, pirminės ekspertizės skyrius; pirminės ekspertizės ekspertė.
MOKSLINĖ VEIKLA:	
Straipsniai	<ol style="list-style-type: none">1. Matulevičienė A, Preikšaitienė E, Linkevičienė L, Radavičius M, Molytė A, Utkus A, Kučinskas V. Heterogeneity of Oral Clefts in Relation to Associated Congenital Anomalies. <i>Medicina (Kaunas)</i> 2013; 49 (2): 61-66.2. Kasnauskiene J, Ciuladaite Z, Preiksaitiene E, Utkus A, Peciulyte A, Kučinskas V. A new single gene deletion on 2q34: ERBB4 is associated with intellectual disability. <i>Am J Med Genet A.</i> 2013 Jun; 161(6):1487-90.3. Kalibataitė I, Rutkauskas V, Preikšaitienė E, Kučinskas V. Establishing genetic diagnosis of intellectual disability in children: diagnostic yield of various genetic approaches. <i>Acta medica Lituanica.</i> 2012(19-4): 409-415.4. Kasnauskiene J, Cimbalištie L, Utkus A, Ciuladaite Z, Preiksaitiene E, Pečiulytė A, Kučinskas V. Two new <i>de novo</i> interstitial duplications covering 2p14–p22.1: clinical and molecular analysis. <i>Cytogenet Genome Res.</i> 2013; 139(1):52-8.5. Preiksaitiene E, Männik K, Dirse V, Utkus A, Ciuladaite Z, Kasnauskiene J, Kurg A, Kucinskas V. A novel <i>de novo</i> 1.8 Mb microdeletion of 17q21.33 associated with intellectual disability and dysmorphic features. <i>Eur J Med Genet.</i> 2012 Nov; 55(11):656-9.6. Preiksaitiene E, Kasnauskiene J, Ciuladaite Z, Tumiene B, Patsalis PC, Kučinskas V. Clinical and molecular characterization of a second case of 7p22.1 microduplication. <i>Am J Med Genet A.</i> 2012 May; 158A(5):1200-3.7. Kasnauskiene J, Ciuladaite Z, Preiksaitiene E, Matulevičienė A, Alexandrou A, Koumbaris G, Sismani C, Pepalytė I, Patsalis PC, Kučinskas V. A single gene deletion on 4q28.3: PCDH18 - A new candidate gene for intellectual disability? <i>Eur J Med Genet.</i> 2012 Apr; 55(4):274-7.8. Čiuladaitė Ž, Preikšaitienė E, Kasnauskienė J, Utkus A, Cimbalištie L, Matulevičienė A, Pečiulytė A, Ambrozaitytė L, Aleksūnienė B, Dirsė V. Molekulinis kariotipavimas ir intelektinės negalios genetinės priežastys: klinikiniai atvejai. <i>Sveikatos mokslai.</i> 2012(1): 67-72.9. Preikšaitienė E, Utkus A, Čiuladaitė Ž, Kasnauskienė J, Kučinskas V. Genetinės diagnozės nustatymas esant intelektinei negaliai: Phelan-McDermid sindromo pavyzdys. <i>Sveikatos mokslai.</i> 2012(1):73-77.10. Čiuladaitė Z, Kasnauskienė J, Cimbalištie L, Preikšaitienė E, Patsalis PC, Kučinskas V. Mental retardation and autism associated with recurrent 16p11.2 microdeletion: incomplete penetrance and variable expressivity. <i>J Appl Genet.</i> 2011 Nov; 52(4):443-9.

	<p>11. Kasnauskiene J, Cimbalistienė L, Ciuladaite Z, Preiksaitiene E, Kučinskiene ZA, Hettinger J, Sismani C, Patsalis P.C, Kučinskas V. <i>De novo</i> 5q35.5 duplication with clinical presentation of Sotos syndrome. <i>Am J Med Genet A</i>. 2011 Oct; 155A(10):2501.</p> <p>12. Preikšaitienė E, Kučinskas V. Molekulinės citogenetikos kliniškas pritaikymas nustatant protinio atsilikimo etiologiją. <i>Laboratorinė medicina</i>. 2010; 3(47):132:136.</p> <p>13. Preikšaitienė E, Matulevičienė A, Utkus A, Kučinskas V, Šliužas V. Multiple congenital anomalies of unknown origin in cases of oral clefts in Lithuania. <i>Indian journal of Maxillofacial and Oral Surgery</i>, 2008; 7(1):177-182.</p> <p>14. Zarakauskaite E, Lunevicius R. Strangulated terminal ileal obstruction due to closed-loop appendix. <i>Lithuanian Surgery</i>, 2008, 6(1): 59-64.</p> <p>15. Zarakauskaitė E, Matulevičienė A, Utkus A, Kučinskas V, Linkevičienė L. Orofacial clefts with associated anomalies in Lithuania. <i>Acta medica Lituanica</i>, 2007; 14(1):19-25.</p> <p>16. Zarakauskaitė E, Prišcepionkaitė Ž, Utkus A, Matulevičienė A. Asmenų su lūpos ir (arba) gomurio skeltumu dermatoglikfika. <i>Laboratorinė medicina</i> 2004; 1(21): 3-7.</p> <p>17. Prišcepionkaitė Ž, Zarakauskaitė E, Utkus A. Mikroanomalijų įvairovė ir dažnumas Lietuvoje gimusių naujagimių grupėje. <i>Pediatrija</i> 2004; 4-5(12-13): 94-98.</p>
Žodiniai pranešimai tarptautinėse konferencijose	<p>1. Preiksaitiene E. Genetic diagnostic workflow for patients with intellectual disability. XI Baltijos šalių laboratorinės medicinos kongresas, Vilnius 2012.</p> <p>2. Zarakauskaite E. Dermatoglyphics in persons with cleft lip and/ or palate. 15 Europos studentų konferencija būsimiems gydytojams ir jaunesiems mokslininkams, Berlynas, 2004.</p> <p>3. Zarakauskaite E, Priscepcionkaite Z. A study of palmar dermatoglyphics in patients with cleft lip with or without cleft palate. II Medicinos studentų mokslinė konferencija, Latvijos universitetas, 2003.</p>
Premijos, stipendijos, diplomai	<p>1. Nacionalinė stipendija jaunajam mokslininkui, Europos žmogaus genetikos konferencija 2013, Paryžius, Prancūzija.</p> <p>2. Sophie Valentina Ambroza (Australija) 2013 metų mokslo premija.</p> <p>3. Vilniaus universiteto rektoriaus 2012 metų mokslo premija jaunajam mokslininkui.</p> <p>4. Diplomas už geriausią 2012 m. jaunųjų mokslininkų konferencijos „Bioateitis: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos“ pranešimą.</p> <p>5. Nacionalinė stipendija jaunajam mokslininkui, Europos žmogaus genetikos konferencija 2010, Geteburgas, Švedija.</p> <p>6. Nacionalinė stipendija jaunajam mokslininkui, Europos žmogaus genetikos konferencija 2007, Nica, Prancūzija.</p> <p>7. Diplomas už III vietą 53 Medicinos mokslų studentų mokslinėje konferencijoje, Rigos Stradina universitetas, 2004.</p> <p>8. Diplomas už II vietą 53 Medicinos mokslų studentų mokslinėje konferencijoje, Rigos Stradina universitetas, 2004.</p> <p>9. Diplomas už I vietą II Medicinos studentų mokslinėje konferencijoje, Latvijos universitetas, 2003.</p> <p>10. Diplomas už prizinę vietą VU MF Studentų mokslinės draugijos LV konferencijoje, 2003.</p>
Stażuotės, kursai	
2013 08 24–2013 08 30	8-ieji Goldrain kliniškos citogenetikos kursai (Goldrain, Italija).
2011 04 30–2011 05 07	Kipro neurologijos ir genetikos institutas, Citogenetikos skyrius (Nikosija, Kipras).
2009 11 22–2009 11 28	Bolonijos universitetas, Medicininės genetikos skyrius (Bolonija, Italija).
2009 04 26–2009 05 02	Medicininės genetikos 22-ieji kursai (Bertinoras, Italija).
Dalyvavimas biomedicininuose tyrimuose	
2012–	Lietuvos-Šveicarijos bendradarbiavimo programa „Moksliniai tyrimai ir plėtra“ bendrų mokslinių tyrimų projektas „Unikalūs genomo persitvarkymai: kilmė, genominiai mechanizmai, funkcinės ir kliniškos pasekmės“ (UNIGENE).

2010–2011	Patogeninių kartotinių sekų reikšmė protinio atsilikimo diagnostikoje (PROGENET).
2009–2012	Protinio atsilikimo diagnostikos gerinimas vaikams iš Rytų Europos ir Centrinės Azijos taikant genetinį apibūdinimą ir bioinformatiką/statistiką (CHERISH).
2007–2008	Genetinių ir genominių lūpos ir (arba) gomurio nesuaugimo pagrindų tyrimai (GENOLOG).
POMĖGIAI	Fotografija, piešimas, grožinė literatūra.

PADĖKA

Dėkoju moksliniams vadovams. prof. Vaidučiui Kučinskui ir prof. Algirdui Utkui už suteiktas galimybes, paramą mokantis ir dirbant genetikos mokslo srityje. Esu dėkinga visam Žmogaus ir medicininės genetikos katedros kolektyvui, be kurio šis darbas nebūtų įmanomas. Ypatingai dėkoju dr. Živilei Čiuladaitei, doc. Jūratei Kasnauskienei ir dr. Almai Molytei už didelį indėlį atliekant šį darbą ir darnų, produktyvų bendradarbiavimą.

Dėkoju šeimoms, dalyvavusioms tyrime, CHERISH projekto partneriams ir įvairių šalių gydytojams genetikams, pasidalinusiems klinikiniais ir molekuliniais pacientų su chromosominiais pokyčiais duomenimis.

Ačiū doc. Gediminui Žukliui už nuotaikingas pamokas.

Už įkvėpimą ir paskatinimą esu dėkinga sūnui Rapolui. Jam ir savo tėveliams labiausiai dėkoju už palaikymą ir pagalbą disertacijos rašymo metu.