

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Beata  
ALEKSIŪNIENĖ

Genominių veiksmų įvertinimas ir  
reikšmė įgimtų širdies ydų  
etiopatogenezėje

**DAKTARO DISERTACIJA**

Biomedicinos mokslai,  
medicina 06B

---

VILNIUS 2019

Disertacija rengta 2014–2018 metais Vilniaus universitete

Mokslinė vadovė – prof. dr. Loreta Cimbalistienė (Vilniaus universitetas,  
biomedicinos mokslai, medicina – 06 B)

Mokslinis konsultantas – prof. dr. Algirdas Utkus (Vilniaus universitetas,  
biomedicinos mokslai, medicina – 06 B)

Skiriu savo Šeimai



# TURINYS

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS .....	8
1. ĮVADAS.....	16
1.1. Tiriamoji problema ir jos aktualumas.....	16
1.2. Tyrimo tikslas.....	17
1.3. Tyrimo uždaviniai .....	17
1.4. Darbo naujumas ir reikšmė.....	17
1.5. Ginamieji teiginiai .....	18
1.6. Darbo aprobacija .....	18
2. LITERATŪROS APŽVALGA .....	21
2.1. Įgimtų širdies ydų apibrėžimas.....	21
2.2. Istorinė apžvalga.....	21
2.3. ĮŠY pasikartojimo rizika .....	22
2.4. Širdies morfogenezę .....	23
2.5. ĮŠY klasifikacija .....	28
2.6. ĮŠY fenotipai ir jų molekulinė patogenezė .....	29
2.7. Šiuolaikinė ĮŠY etiologijos samprata .....	45
2.7.1. Negenetiniai rizikos veiksniai .....	45
2.7.2. Genetiniai veiksniai .....	46
2.7.2.1. Sindrominės ĮŠY .....	47
2.7.2.2. Nesindrominės ĮŠY .....	51
2.8. Kopijų skaičiaus pokyčiai .....	55
2.8.1. Patogeninių KSP nustatymas ĮŠY grupėje .....	56
2.8.1.1. Sindrominės ĮŠY, nulemtos KSP .....	57
2.8.1.2. ĮŠY su kitomis įgimtomis raidos anomalijomis, nulemtos KSP .....	61
2.8.1.3. Izoliuotos ĮŠY, nulemtos KSP.....	61
3. TYRIMO METODAI.....	64
3.1. Tiriamųjų asmenų atranka .....	64
3.2. Tiriamųjų asmenų klinikinių duomenų rinkimas .....	65
3.3. Tiriamųjų asmenų grupės genetiniai tyrimai .....	65

3.3.1.	Vieno nukleotido polimorfizmo lyginamosios genomo hibridizacijos tyrimas .....	65
3.3.1.1.	Genotipavimas VNP lustais.....	66
3.3.1.2.	Genotipavimo duomenų analizė .....	67
3.3.1.3.	DNR mėginių, genotipuotų VNP ir genotipavimo proceso kokybės kontrolė .....	68
3.3.1.4.	Rezultatų interpretavimas ir bioinformacinė analizė ....	69
3.4.	Kontrolinės grupės genetinių tyrimų duomenų rinkimas .....	71
3.5.	Patogeninių / galimai patogeninių pokyčių tvirtinimas ir kilmės nustatymas .....	72
3.6.	Naujų ĮŠY genų kandidatų nustatymas .....	73
3.7.	Biostatistinė analizė.....	73
4.	REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	75
4.1.	Įgimtų širdies ydų pasiskirstymas tiriamųjų grupėje .....	75
4.2.	KSP nustatymas tiriamųjų grupėje .....	82
4.3.	Diagnostinis KSP nustatymo efektyvumas tiriamųjų grupėje.....	86
4.4.	KSP, siejamų su žinomais genetiniais sindromais ir ĮŠY, apibūdinimas .....	87
4.4.1.	KSP, apimančių ĮŠY žinomus genus / genus kandidatus, apibūdinimas .....	92
4.5.	Naujų ĮŠY genų kandidatų nustatymas ir apibūdinimas .....	94
4.5.1.	Genų, įtrauktų į patogeninius KSP, analizė.....	97
4.5.2.	Naujų ĮŠY genų kandidatų apibūdinimas.....	101
4.6.	KSP palyginimas tiriamojoje ir kontrolinėje grupėse.....	102
4.6.1.	KSP dažnių palyginimas tiriamojoje ir kontrolinėje grupėse... ..	102
4.6.2.	KSP dažnių palyginimas grupėse, suskirstytose pagal KSP dydį ( $\leq 500$ kb ir $\geq 501$ kb) .....	104
4.7.	KSP savybių palyginimas tiriamojoje ir kontrolinėje grupėse ir funkcinė įtaka .....	108
4.7.1.	KSP dydžio palyginimas tiriamojoje ir kontrolinėje grupėse... ..	108
4.7.2.	Genų, kuriuos apima KSP, skaičiaus palyginimas tiriamojoje ir kontrolinėje grupėse.....	110

4.7.3. Genų, kuriuos apėmė reti KSP, haplonepakankamumo įverčio palyginimas tiriamojoje ir kontrolinėje grupėse.....	111
4.8. Rezultatų aptarimas .....	113
IŠVADOS.....	120
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	122
PRIEDAI .....	153
PADĖKA.....	165

## SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

ACMG – Amerikos medicinos genetikos ir genomikos kolegija (angl. *American College of Medical Genetics and Genomics*)

AD – autosominis dominantinis paveldėjimo tipas

Akt – angl. *V-akt murine thymoma viral oncogene homolog signaling*

AR – autosominis recesyvinis paveldėjimo tipas

bp – bazių pora

BP1 – angl. *breakpoint 1*

BP2 – angl. *breakpoint 2*

CHERISH – tarptautinio projekto „Proteinio atsilikimo diagnostikos gerinimas vaikams iš Rytų Europos ir Centrinės Azijos taikant genetinį apibūdinimą ir bioinformatiką / statistiką“ akronimas (angl. *Improving diagnoses of mental retardation in children in central eastern Europe and central Asia through genetic characterisation and bioinformatics / statistics*)

DECIPHER – angl. *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources database*

FISH – fluorescencinė *in situ* hibridizacija

ECARUCA – angl. *European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations*

HI – haplonepakankamumo įvertis

GO – angl. *gene ontology*

GWAS – viso genomo asociacijos tyrimai (angl. *genome-wide association studies*)

ISCN – tarptautinė žmogaus citogenetikos nomenklatūros sistema (angl. *International System for Human Cytogenetic Nomenclature*)

ĮŠY – įgimtos širdies ydos

kb – kilobazė

KSP – kopijų skaičiaus pokytis (angl. *copy number variation, CNV*)

LCR – mažo kopijų skaičiaus pasikartojimų sankaupos (angl. *cluster of low-copy repeats – LCRs*)

LITGEN – nacionalinio projekto „Lietuvos populiacijos genetinė įvairovė ir sandaros kitimai, susiję su evoliucija ir dažniausiai paplitusiomis ligomis“ akronimas

LGH – lyginamoji genomo hibridizacija

Mb – megabazė

MGI – angl. *Mouse Genome Informatics*

MLPA – dauginė liguojamų zondų amplifikacija (angl. *multiplex ligation – dependent probe amplification*)



NCBI – JAV nacionalinis biotechnologijų informacijos centras (angl. *National Center for Biotechnology Information*)

OMIM – pagal Mendelio dėsnius paveldimų ligų elektroninis rinkinys (angl. *Online Mendelian Inheritance in Man*)

RefSeq – referentinė seka (angl. *Reference Sequences*)

TLK-10-AM – Tarptautinė statistinės ligų ir sveikatos sutrikimų klasifikacija. 10-asis pataisytas ir papildytas leidimas, Australijos modifikacija

TL-PGR – tikro laiko polimerazės grandininė reakcija (angl. *real time – polymerase chain reaction, RT – PCR*)

VNP – vieno nukleotido polimorfizmas (angl. *single nucleotide polymorphism, SNP*)

VNP-LGH – vieno nukleotido polimorfizmo lyginamoji genomo hibridizacija (angl. *SNP comparative genomic hybridization, SNP-CGH*)

VNTR – variabilaus skaičiaus tandeminiai pasikartojimai (angl. *variable numbers of tandem repeats*)

UCSC – angl. *University of California santa Cruz*

VŠĮ VUL SK – Viešoji įstaiga Vilniaus universiteto ligoninė Santaros klinikos

VŠĮ VUL SK MGC – Viešoji įstaiga Vilniaus universiteto ligoninė Santaros klinikos Medicininės genetikos centras

VU MF BMI ŽMGK – Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Biomedicinos mokslų instituto Žmogaus ir medicininės genetikos katedra

Wnt – angl. *Wingless-related integration site signaling*

## **Baltymų santrumpos**

ACTA2 – angl. *actin, alpha-2, smooth muscle, aorta*  
ABCC9 – angl. *ATP-binding cassette, subfamily C, member 9*  
ACP6 – angl. *acid phosphatase 6, lysophosphatidic*  
ACTC1 – angl. *actin, alpha, cardiac muscle 1*  
ACVR1/ALK2 – angl. *activin A receptor type 1*  
ACVR2B – angl. *activin A receptor type 2B*  
ADAM19 – angl. *ADAM metalloproteinase domain 19*  
ADAMTS3 – angl. *ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 3*  
AHDC1 – angl. *AT-hook DNA binding motif containing 1*  
ALDH1A2 – angl. *aldehyde dehydrogenase 1 family member A2*  
ANKRD1 – angl. *ankyrin repeat domain 1*  
ANKRD11 – angl. *ankyrin repeat domain 11*  
ANKRD17 – angl. *ankyrin repeat domain 17*  
ANKRD26P1 – angl. *ankyrin repeat domain 26 pseudogene 1*  
APLN – angl. *apelin*  
BCL9 – angl. *B cell CLL/lymphoma 9*  
BMP – angl. *bone morphogenetic protein*  
BMPRI1 – angl. *bone morphogenetic protein receptor type 1A*  
BMPRI2 – angl. *bone morphogenetic protein receptor type 2*  
BRAF – angl. *B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase*  
CASP3 – angl. *caspase 3*  
CAV1 – angl. *caveolin 1*  
CBL – angl. *Cbl proto-oncogene*  
CCDC11 – angl. *coiled-coil domain-containing protein 11*  
CDK13 – angl. *cyclin dependent kinase 13*  
CELSR1 – angl. *cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 1*  
CFC1 – angl. *cryptic protein*  
CHD1L – angl. *chromodomain helicase DNA binding protein 1 like*  
CHD4 – angl. *chromodomain helicase DNA binding protein 4*  
CHD7 – angl. *chromodomain helicase DNA binding protein 7*  
CHD1L – angl. *chromodomain helicase DNA binding protein 1 like*  
CHRM3 – angl. *cholinergic receptor muscarinic 3*  
CHRNA3 – angl. *cholinergic receptor nicotinic alpha 3 subunit*  
CYFIP1 – angl. *cytoplasmic fmrp-interacting protein 1*  
CITED2 – angl. *Cbp/p300 interacting transactivator with Glu/Asp rich carboxy-terminal domain 2*  
CLCN6 – angl. *chloride voltage-gated channel 6*  
CREBBP – angl. *CREB binding protein*  
CRELD1 – angl. *cysteine rich with EGF like domains 1*  
CRKL – angl. *CRK like proto-oncogene, adaptor protein*  
CRX – angl. *cone-rod homeobox-containing gene*  
CTHRC1 – angl. *collagen triple-helix repeat-containing protein 1*  
DNAH10 – angl. *dynein, axonemal, heavy chain 10*

DUSP1 – angl. *dual specificity phosphatase 1*  
DVL1 – angl. *dishevelled segment polarity protein 1*  
DVL3 – angl. *dishevelled segment polarity protein 3*  
ECE2 – angl. *endothelin converting enzyme 2*  
EHMT1 – angl. *euchromatic histone methyltransferase 1*  
ELN – angl. *elastin*  
ERBB4 – angl. *erb-b2 receptor tyrosine kinase 4*  
ERMARD – angl. *ER membrane associated RNA degradation*  
EVC – angl. *EvC ciliary complex subunit 1*  
EVC2 – angl. *EvC ciliary complex subunit 2*  
FBN1 – angl. *fibrillin 1*  
FGF – angl. *fibroblast growth factor*  
FGF9 – angl. *fibroblast growth factor 9*  
FGFRL1 – angl. *fibroblast growth factor receptor-like 1*  
FKBP6 – angl. *FK506 binding protein 6*  
FLNA – angl. *filamin A*  
FMO5 – angl. *flavin containing monooxygenase 5*  
FOG2/ZFPM2 – angl. *zinc finger protein, FOG family member 2*  
FOXC2 – angl. *forkhead box C2*  
FOXF1 – angl. *forkhead box F1*  
FOXH1 – angl. *forkhead box H1*  
GATA4 – angl. *GATA-binding protein 4*  
GATA5 – angl. *GATA-binding protein 5*  
GATA6 – angl. *GATA-binding protein 6*  
GDF1 – angl. *growth differentiation factor 1*  
GJA1 – angl. *gap junction protein alpha 1*  
GJA5 – angl. *gap junction protein alpha 5*  
GPC3 – angl. *glypican 3*  
HAND1 – angl. *heart- and neural crest derivatives-expressed 1*  
HAND2 – angl. *heart- and neural crest derivatives-expressed 2*  
HCN4 – angl. *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 4*  
HDAC4 – angl. *histone deacetylase 4*  
HRAS – angl. *HRas proto-oncogene, GTPase*  
IFT88 – angl. *intraflagellar transport 88*  
IGF1R – angl. *insulin like growth factor 1 receptor*  
IRX4 – angl. *iroquois homeobox 4*  
JAG1 – angl. *jagged 1*  
JUN – angl. *Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit*  
JUP – angl. *junction plakoglobin*  
KANSL1 – angl. *KAT8 regulatory NSL complex subunit 1*  
KCNG2 – angl. *potassium voltage-gated channel modifier subfamily G member 2*  
KCNJ8 – angl. *potassium channel, inwardly rectifying, subfamily J, member 8*

KCNH2 – angl. *potassium voltage-gated channel subfamily H member 2*  
 KCTD13 – angl. *potassium channel tetramerization domain containing 13*  
 KDM6A – angl. *lysine demethylase 6A*  
 KMT2D – angl. *lysine methyltransferase 2D*  
 KRAS – angl. *KRAS proto-oncogene, GTPase*  
 KRIT1 – angl. *ankyrin repeat containing*  
 LEFTY1 – angl. *left-right determination factor 1*  
 LEFTY2 – angl. *left-right determination factor 2*  
 LMNA – angl. *lamin A/C*  
 MAP2K1/MEK1 – angl. *mitogen-activated protein kinase kinase 1*  
 MAP2K2/MEK2 – angl. *mitogen-activated protein kinase kinase 2*  
 MAPK12 – angl. *mitogen-activated protein kinase 12*  
 MAPK7 – angl. *mitogen-activated protein kinase 7*  
 MCTP2 – angl. *multiple C2 and transmembrane domain containing 2*  
 MED13L – angl. *mediator complex subunit 13 like*  
 MED15 – angl. *mediator complex subunit 15*  
 MED9 – angl. *mediator complex subunit 9*  
 MEF2 – angl. *myocyte enhancer factor-2 family*  
 MEF2A – angl. *myocyte enhancer factor 2A*  
 MEF2C – angl. *myocyte enhancer factor 2C*  
 MESP1 – angl. *mesoderm posterior basic helix-loop-helix transcription factor 1*  
 MESP2 – angl. *mesoderm posterior basic helix-loop-helix transcription factor 2*  
 MFAP4 – angl. *microfibril associated protein 4*  
 MYH6 – angl. *myosin heavy chain 6*  
 MYH7 – angl. *myosin heavy chain 7*  
 MYH11 – angl. *myosin heavy chain 11*  
 MYOCD – angl. *myosin heavy chain 7*  
 MNAT1 – angl. *CDK activating kinase assembly factor*  
 MTHFR – angl. *methylenetetrahydrofolate reductase*  
 MTR – angl. *5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase*  
 MTRR – angl. *5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase*  
 NFATC1 – angl. *nuclear factor of activated T cells 1*  
 NIPA1 – angl. *NIPA magnesium transporter 1*  
 NIPA2 – angl. *NIPA magnesium transporter 2*  
 NKX2-5 – angl. *NK2 homeobox 5*  
 NKX2-6 – angl. *NK2 homeobox 6*  
 NODAL – angl. *nodal growth differentiation factor*  
 NOS3 – angl. *nitric oxide synthase 3*  
 NOTCH1 – angl. *translocation-associated notch protein TAN-1*  
 NOTCH2 – angl. *neurogenic locus notch homolog protein 2*  
 NPPA – angl. *natriuretic peptide A*  
 NPPB – angl. *natriuretic peptide B*

NR2F2 – angl. *nuclear receptor subfamily 2 group F member 2*  
NRAS – angl. *NRAS proto-oncogene, GTPase*  
NRG4 – angl. *neuregulin 4*  
NRP1 – angl. *neuropilin 1*  
NSD1 – angl. *nuclear receptor binding SET domain protein 1*  
NSD2 (WHSC1) – angl. *nuclear receptor-binding set domain protein 2*  
NTRK3 – angl. *neurotrophic receptor tyrosine kinase 3*  
PAFAH1B1 – angl. *platelet activating factor acetylhydrolase 1b regulatory subunit 1*  
PAK2 – angl. *p21 (RAC1) activated kinase 2*  
PCDHA – angl. *cadherin-related neuronal receptor 1*  
PDGFRA – angl. *platelet derived growth factor receptor alpha*  
PDLIM3 – angl. *actinin-associated lim protein*  
PER2 – angl. *period circadian regulator 2*  
PITX2 – angl. *paired-like homeodomain transcription factor 2*  
PLXNA2 – angl. *plexin A2*  
RNF115 – angl. *ring finger protein 115*  
PRKAB2 – angl. *protein kinase AMP-activated non-catalytic subunit beta 2*  
PRKAG2 – angl. *protein kinase AMP-activated non-catalytic subunit gamma 2*  
PRKCI – angl. *protein kinase C iota*  
PRKD1 – angl. *protein kinase D1*  
PTEN – angl. *phosphatase and tensin homolog*  
PTPN11 – angl. *protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11*  
PTPRE – angl. *protein tyrosine phosphatase, receptor type E*  
RAF1 – angl. *Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase*  
RAI1 – angl. *retinoic acid induced 1*  
RIT1 – angl. *Ras like without CAAX motif 1*  
SAP130 – angl. *Sin3A associated protein 130*  
SEMA3C – angl. *semaphorin 3C*  
SEMA3D – angl. *semaphorin 3D*  
SEMA3E – angl. *semaphorin 3E*  
SHH – angl. *sonic hedgehog*  
SHOC2 – angl. *leucine rich repeat scaffold protein*  
SLC25A4 – angl. *solute carrier family 25 member 4*  
SMAD2 – angl. *SMAD family member 2*  
SMAD6 – angl. *SMAD family member 6*  
SMADIP1 – angl. *zinc finger E box-binding homeobox 2*  
SMARCD3 – angl. *SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 3*  
SMC1A – angl. *structural maintenance of chromosomes 1A*  
SNAI1 – angl. *snail family transcriptional repressor 1*  
SOD2 – angl. *superoxide dismutase 2*  
SORBS2 – angl. *sorbin and SH3 domain containing 2*  
SOS1 – angl. *SOS Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor 1*

SP3 – angl. *Sp3 transcription factor*  
SREBF1 – angl. *sterol regulatory element binding transcription factor 1*  
SRF – angl. *serum response factor*  
SRI – angl. *sorcina*  
STRA6 – angl. *stimulated by retinoic acid 6*  
TA – angl. *Brachyury protein homolog*  
TAB2 – angl. *TGF-beta activated kinase 1 (MAP3K7) binding protein 2*  
TALDO1 – angl. *transaldolase 1*  
TBX1 – angl. *T-box 1*  
TBX2 – angl. *T-box 2*  
TBX20 – angl. *T-box 20*  
TBX5 – angl. *T-box 5*  
TBX6 – angl. *T-box 6*  
TCTE3 – angl. *t-complex-associated-testis-expressed 3*  
TDGF – angl. *teratocarcinoma-derived growth factor 1*  
TDGF1 – angl. *teratocarcinoma-derived growth factor 1*  
TERT – angl. *telomerase reverse transcriptase*  
TFAP2B – angl. *transcription factor AP-2 beta*  
TGF- $\beta$  – angl. *transforming growth factor superfamily*  
TGFB1 – angl. *transforming growth factor-beta receptor, type I*  
TGFB2 – angl. *transforming growth factor-beta receptor, type II*  
TLL1 – angl. *tolloid like 1*  
TOP2A – angl. *DNA topoisomerase II alpha*  
TRNAU1AP – angl. *tRNA selenocysteine 1 associated protein 1*  
TRPM8 – angl. *transient receptor potential cation channel subfamily M member 8*  
TUBGCP5 – angl. *tubulin gamma complex associated protein 5*  
TXNL4A – angl. *thioredoxin like 4A*  
VEGFA – angl. *vascular endothelial growth factor A*  
XIRP1 – angl. *xin actin binding repeat containing 1*  
ZEB2 – angl. *zinc finger E-box binding homeobox 2*  
ZIC3 – angl. *Zic family member 3*

### **Įgimtos širdies ydos:**

AAL – atviras arterinis latakas  
AoA – aortos atrezija  
AOA – atvira ovalioji anga  
AoKo – aortos koarktacija  
AoS – aortos stenozė  
AVK – atrioventrikulinė komunikacija  
BAK – bendras arterinis kamienas  
DAPVĮ – dalinis anomalus plaučių venų įtekėjimas  
DAV – dviburis aortos vožtuvas

DIDS – dvigubas ištekėjimas iš dešiniojo skilvelio  
EB – Ebšteino anomalija  
HK – hipertrofinė kardiomiopatija  
HS – Heterotaksijos sindromas  
KSITD – kairiojo skilvelio išstūmimo trakto defektai  
KŠHS – kairiosios širdies hipoplazijos sindromas  
MVN – mitralinio vožtuvo nesandarumas  
PAA – plaučių arterijos atrezija  
PAL(B) – pertrauktas aortos lankas (B tipas)  
PAPVĮ – plaučių venų įtekėjimas  
PAS – plaučių arterijos stenozė  
PAVS – plaučių arterijos vožtuvo stenozė  
PPD – prieširdžių pertvaros defektas  
PPS – periferinė plaučių stenozė  
SKT – stambiųjų kraujagyslių transpozicija  
SPD – skilvelių pertvaros defektas  
SVAS – subvožtuvinė aortos stenozė  
TA – *truncus arteriosus*  
TF – tetradą Fallot  
VAPVD – visiškai anomalus plaučių venų drenažas

## ĮVADAS

### 1.1. Tiriamoji problema ir jos aktualumas

Įgimtos širdies ydos (ĮŠY) yra dažniausios įgimtos raidos anomalijos naujagimystėje, nustatomos 8 iš 1 000 gyvų gimusių naujagimių [van der Linde *et al.*, 2011; Mozaffarian *et al.*, 2016]. Higienos instituto duomenimis, 2016 m. Lietuvoje gimė 412 naujagimių, turinčių ĮŠY [<http://www.hi.lt/medical-data-of-births>]. Kai kurios ĮŠY turi blogą išgyvenamumo prognozę ir yra viena iš pagrindinių neinfekcinių mirties priežasčių naujagimystėje [Billett *et al.*, 2008; Connor *et al.*, 2014]. Daugelio ĮŠY etiologija vis dar yra neaiški.

Nustatyti ĮŠY etiologiją svarbu ĮŠY turinčiam pacientui ir jo šeimai ne tik psichosocialiniu požiūriu, bet ir planuojant šeimą. Dėl sėkmingo chirurginio gydymo ir pagerėjusio išgyvenamumo daugelis vaikų, turinčių ĮŠY, pasiekia pilnametystę ir reproduktyvų amžių, todėl didėja ĮŠY turinčių suaugusių asmenų populiacija, ir informacija apie ligos etiologiją ir pasikartojimo riziką tampa itin aktuali.

Anksti nustatyta genetinė ĮŠY diagnozė svarbi keliais klinikiniais aspektais. Priežastinių genominių variantų ir jų lemiamų ligų, pvz., genetinio sindromo arba ĮŠY lydinčių neurologinių ligų, nustatymas iš esmės keičia paciento gydymo strategiją ir atveria daugiadisciplinės optimizuotos sveikatos priežiūros galimybes. Nustačius genominius variantus ir juose esančius genus gaunama informacija apie ligos paveldėjimą ir pasikartojimo riziką leidžia suteikti pacientui ir jo šeimai tikslų genetinį konsultavimą ir prenatalinę diagnostiką [Chaix *et al.*, 2016]. Naujų genų kandidatų ir molekulinį kelių atradimas aktualus moksliniais tikslais. Naujos žinios apie ĮŠY patofiziologinius procesus leidžia kurti modernius diagnostinius žymenis kuo anksčiau nustatyti ĮŠY ir tikslus terapinių preparatų taikinius.

Naujausi moksliniai tyrimai atskleidė, kad kai kurie genominiai variantai yra svarbūs modifikuojantys veiksniai, siejami su pooperacinėmis komplikacijomis ir keliskart didesne mirties rizika po širdies operacijų ar transplantacijų [Kim *et al.*, 2016; Ramroop *et al.*, 2017]. Šiuo požiūriu yra svarbus individualių genetinių, taip pat negenetinių (tokių kaip paciento amžius, lytis, sveikatos ir gydymo istorija) veiksnių, turinčių įtakos paciento sveikatos būklei ir atsakai į gydymą, įvertinimas [Russell *et al.*, 2018].



## 1.2. Tyrimo tikslas

Nustatyti ir įvertinti genominių variantų ir genų kandidatų reikšmę įgimtų širdies ydų etiopatogenezeje.

## 1.3. Tyrimo uždaviniai

1. Sudaryti tiriamųjų, turinčių įgimtas širdies ydas, grupę ir įvertinti jos etiologinę struktūrą.
2. Nustatyti patogeninius kopijų skaičiaus pokyčius įgimtas širdies ydas turinčių tiriamųjų grupėje ir įvertinti jų reikšmę įgimtoms širdies ydoms pasireikšti.
3. Naudojant bioinformacinius genų prioritetizavimo metodus, nustatyti patogeniniuose kopijų skaičiaus pokyčiuose esančius genus kandidatus, siejamus su įgimtomis širdies ydomis.
4. Įvertinti vieno nukleotido polimorfizmo – lyginamosios genomo hibridizacijos metodo diagnostinį patogeninių ir galimai patogeninių kopijų skaičiaus pokyčių nustatymo efektyvumą įgimtų širdies ydų grupėje.
5. Atlikti retų geninių kopijų skaičiaus pokyčių paplitimo analizę tiriamųjų ir kontrolinėje grupėse ir įvertinti jų ryšį su įgimtomis širdies ydomis.

## 1.4. Darbo naujumas ir reikšmė

Šiame darbe atliktas asmenų, turinčių ĮŠY, genominių variantų įvertinimas. Tai pirmasis mokslinis darbas, kurio metu modernios genomo analizės technologijos pritaikytos ĮŠY tyrimams Lietuvoje. Darbe įvertinta fenotipinė ir genetinė ĮŠY įvairovė ir heterogeniškumas. Naudojant lyginamosios genomo hibridizacijos analizę, nustatyti unikalūs patogeniniai genominiai variantai ir galimi ĮŠY genai kandidatai. Pritaikius bioinformacinius įrankius, atlikta patogeninių genominių variantų funkcinė analizė. Šiame darbe buvo nustatytas didelių genominių pokyčių ir įgimtų širdies anomalijų ryšys.

Buvo nustatytos genetinių ligų diagnozės, leidžiančios tiriamiesiems ir jų šeimos nariams genetinio konsultavimo metu suteikti informaciją apie ligos pasikartojimą šeimoje ir įvertinti ligos riziką palikuonims.

Gauti rezultatai papildė ankstesnių kopijų skaičiaus pokyčių (KSP) tyrimus naujais duomenimis ir yra vertingi tolesniems moksliniams tyrimams. Tokio pobūdžio tyrimai yra ypač tinkami naujiems genominiams variantams,

svarbiems širdies vystymuisi bei širdies ir kraujagyslių ligų patogenezai, nustatyti.

### 1.5. Ginamieji teiginiai

1. Įgimtos širdies ydos pasižymi dideliu genetiniu ir fenotipiniu heterogeniškumu.
2. Patogeniniai kopijų skaičiaus pokyčiai yra svarbūs priežastiniai veiksniai sindrominių įgimtų širdies ydų ir įgimtų širdies ydų su kitomis įgimtomis raidos anomalijomis grupėse.
3. Unikalus kopijų skaičiaus pokyčiai, lokalizuoti įvairiose genomo vietose, apima su skirtingomis įgimtomis širdies ydomis siejamus specifinius genus.
4. Plataus masto vieno nukleotido polimorfizmo – lyginamoji genomo hibridizacija yra efektyvus metodas patogeniniams genominiams pokyčiams nustatyti įgimtų širdies ydų grupėje.
5. Reti geniniai kopijų skaičiaus pokyčiai pasižymi didesniu dažniu įgimtų širdies ydų grupėje ir gali būti reikšmingi joms pasireikšti.

### 1.6. Darbo aprobacija

#### Publikacijos disertacijos tema

1. **Aleksiūnienė B**, Matulevičiūtė R, Matulevičienė A, Burnytė B, Krasovskaja N, Ambrozaitytė L, Mikštienė V, Diršė V, Utkus A, Kučinskas V. Opposite chromosome constitutions due to a familial translocation t(1;21)(q43;q22) in 2 cousins with development delay and congenital anomalies: A case report. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Apr; 96(16):e6521.
2. **Aleksiūnienė B**, Preiksaitienė E, Morkūnienė A, Ambrozaitytė L, Utkus A. A *de novo* 1q22q23.1 interstitial microdeletion in a girl with intellectual disability and multiple congenital anomalies including congenital heart defect. *Cytogenet Genome Res*. 2018; 154: 6–11.
3. Vaisvilas M, Diršė V, **Aleksiūnienė B**, Tamulienė I, Cimbališienė L, Utkus A, Rascon J. Acute pre-B lymphoblastic leukemia and congenital anomalies in a child with a *de novo* 22q11.1q11.22 duplication. *Balkan Journal of Medical Genetics*. 2018; 21(1):87–92.

#### Žodiniai pranešimai

1. Matulevičienė A, **Aleksiūnienė B**, Mikštienė V, Krasovskaja N, Griškevičius L, Utkus A, Kučinskas V. Dup(1)(q43–

- q44)&del(21)(q22.2–q22.3) characterized by facial dysmorphism, congenital heart defect and mental retardation. 25th European Dysmorphology Meeting. 2014 m., Strasbūras, Prancūzija.
2. **Aleksiūnienė B**, Matulevičiūtė R, Čiuladaitė Ž, Matulevičienė A, Utkus A, Kučinskas V. Coarctation of the aorta with dysmorphic features in a patient with triplication of 15q26.1-q26.3: clinical and molecular analysis. 26th European Dysmorphology Meeting. 2015 m. Strasbūras, Prancūzija.
  3. Matulevičienė A, **Aleksiūnienė B**, Tamulienė L, Liubšys A, Čiuladaitė Ž, Utkus A, Kučinskas V. A novel *de novo* del(4)(q28.2-qter)&del(8)(pter-p23.1) due to unbalanced translocation in a girl: clinical and molecular analysis. 26th European Dysmorphology Meeting. 2015 m., Strasbūras, Prancūzija.
  4. **Aleksiūnienė B**, Ambrozaitytė L, Matulevičienė A, Krasovskaja N, Utkus A. Comparative whole genome hybridization methods in molecular diagnostics. XIII Baltic Congress in Laboratory Medicine. 2016 m., Tartu, Estija.
  5. **Aleksiūnienė B**, Ambrozaitytė L, Dagyte E, Laimutė R, Molytė A, Utkus A. Identification of rare copy number variants in patients with congenital heart diseases. XIV Baltic Congress Of Laboratory Medicine. 2018 m., Vilnius, Lietuva.
  6. Braždžiūnaitė D, Laimutė R, **Aleksiūnienė B**, Dagyte E, Ambrozaitytė L, Benušienė E, Cimbalistienė L, Utkus A. Molecular karyotyping: clinical utility and practice. IX tarptautinė mokslinė konferencija „Retų ligų gydymo inovacijos“. 2018 m., Vilnius, Lietuva.

#### Stendiniai pranešimai

1. Cimbalistienė L, **Aleksiūnienė B**, Dirsė V, Tamulienė I, Utkus A. 6,6 Mb *de novo* 22q11.1-q11.22 duplication in a patient with anomalous pulmonary venous drainage, intestinal malrotation and pre B acute lymphoblastic leukemia. The European Human Genetics Conference, 2016 m., Barselona, Ispanija.
2. Preikšaitienė E, Maldžienė Ž, **Aleksiūnienė B**, Kučinskas V. Mild intellectual disability, congenital heart defect and skeletal abnormalities in three patients with 4q13.3 microdeletion. The European Human Genetics Conference, 2016 m., Barselona, Ispanija.

#### Elektroniniai pranešimai

1. **Aleksiūnienė B**, Matulevičienė B, Benušienė E, Tarutis V. Hypoplastic left heart syndrome in a case with partial 18p monosomy and partial

- 20q trisomy. European Human Genetics Conference, 2015 m., Glazgas, D. Britanija.
2. **Aleksiūnienė B**, Cimbališienė L, Dirsė V, Gineikienė E, Marcinkutė R, Utkus A. *De novo* 15q26.2q26.3 duplication and 15q26.3 deletion in a patient with an anomalous parietal sutures. The European Human genetics Conference, 2016 m., Barselona, Ispanija.
  3. **Aleksiūnienė B**, Matulevičienė A, Ambrozaitytė L, Jakutis V, Utkus A. Hypoplastic right ventricle, dysmorphic features and brain structural anomalies in a patient with a *de novo* 1p36.33p36.32 deletion. The European Human genetics Conference, 2017 m., Kopenhaga, Danija.
  4. **Aleksiūnienė B**, Tumienė B, Utkus A. *AHDC1* gene truncating 1p36.11p35.3 microdeletion in a patient with developmental delay, dysmorphic features and congenital heart defects. The European Human Genetics Conference, 2018 m., Milanai, Italija.
  5. Blažytė EM, Samsonė VG, Matulevičienė A, **Aleksiūnienė B**, Burnytė B, Dagtė E, Tumienė B, Utkus A. The spectrum of associated congenital malformations in Down syndrome: a retrospective Lithuanian cohort study. The European Human genetics Conference, 2018 m., Milanai, Italija.

## 2. LITERATŪROS APŽVALGA

### 2.1. Įgimtų širdies ydų apibrėžimas

**Įgimtos širdies ydos (IŠY)** –įgimti širdies anatominių struktūrų ir / arba stambiųjų kraujagyslių vystymosi defektai.

### 2.2. Istorinė apžvalga

IŠY kronika, trunkanti jau daugiau nei 350 metų, – dramatiška kardiologijos, širdies chirurgijos ir širdies vystymosi supratimo evoliucija. Pirmieji širdies anomalijų rašytiniai šaltiniai buvo molio lentelės, datuojamos 4 000 metų prieš Kristų, kuriose babiloniečiai išvardijo 62 širdies anomalijas ir jų pranašingas reikšmes. Per šimtmečius vystėsi ir evoliucionavo daugybė naujų koncepcijų. Jau 1673 m. danų anatomas Niels Stenson pirmą kartą aprašė TF, o 1888 m. prancūzų gydytojas Étienne-Louis Arthur Fallot detaliai apibūdino šį širdies anomalijų kompleksą ir pasiūlė terminą „tetralogy“.

Žinių apie IŠY evoliucija skirstoma į keturias pagrindines eras [Neill and Clark, 1994]. Pirmoji era, vadinama **patologinės anatomijos era** (iki 1940-ųjų metų), kurią sudarė aprašomieji darbai apie širdies patologinę anatomiją. Vienas iš reikšmingiausių darbų buvo 1936 m. kanadiečių gydytojos Maude Abbott sudarytas ir išleistas pirmasis metodinis katalogas „Atlas of Congenital Cardiac Disease“, kuriame autorė pateikė 1000 širdies defektų atvejų klinikinius ir anatominius aprašus [Abbott, 1936]. Šis katalogas laikomas pirmąja klinikinės kardiologijos klasifikacijos sistema [Hinton, 2013].

Antroji yra **klinikinės fiziologijos ir chirurgijos era** (1940–1970). Ji svarbi pirmosiomis širdies operacijomis. 1938 m. Robert Gross atliko atviro arterinio latako uždarymo operaciją septynmetei mergaitei, ji buvo pirmoji pacientė, išgyvenusi širdies operaciją [Gross and Hubbard, 1939]. 1944 m. pirmą kartą atlikta Blalock-Taussig anastomozė [Blalock and Taussig, 1945], 1954 m. – atvira širdies operacija [Lillehei et al., 1955; Warden, 1989]. 1949 m. kardiologas Maurice Campbell pirmasis pateikė hipotezę apie genetinių ir aplinkos veiksnių įtaką IŠY [Campbell, 1949], o 1968 m. buvo pasiūlyta daugiaveiksnių paveldėjimo hipotezė IŠY etiologijoje [Nora, 1968].

Trečioji era, vadinama **kūdikių era** (1970–1990), pasižymėjo sėkminga kardiochirurgine korekcija naujagimiams, prostaglandinų terapijos įdiegimu. Didelis proveržis įvyko atsiradus echokardiografijai, atsirado

galimybė atlikti tikslesnę ir ankstyvesnę ĮŠY diagnostiką [Neill and Clark, 1994].

Dabartinė **širdies vystymosi** era (1990– iki dabar) skirta molekulinį širdies vystymosi procesų tyrimams. Širdies vystymosi procesai tapo daugiadisciplininių mokslų – ląstelės ir molekulinės biologijos, žmogaus genetikos ir gyvūnų modelių – tyrimų objektu. Pozicinio klonavimo, sankibos analizės, genų kandidatų sekoskaitos ir kariotipavimo metodai ilgą laiką buvo naudojami sindrominių ĮŠY genetinių veiksnių paieškai. Šių tyrimų rezultatai įrodė genetinių veiksnių svarbą nedidelėje ĮŠY kohortoje. Taip pat šių tyrimų metu buvo nustatyti ĮŠY genai, kurių dauguma koduoja transkripcijos veiksnių ir signalų perdavimo baltymus. Didelis ĮŠY genetinių veiksnių paieškos proveržis įvyko atradus naują genomo variabilumo formą – kopijų skaičiaus pokyčius (KSP). Nustatyta, kad apie 10 proc. asmenų, turinčių ĮŠY, turi retus *de novo* KSP [Gelb, 2015]. Pastaruoju metu žmogaus genomo sekoskaitos metodai leidžia nustatyti *de novo* mutacijas genuose, kurių raiška vyksta širdies embriogenezeje.

### 2.3. ĮŠY pasikartojimo rizika

Dauguma ĮŠY turinčių asmenų pasiekia reproduktyvų amžių, todėl tampa ypač aktualu įvertinti tikslią ĮŠY pasikartojimo riziką šeimoje [Baumgartner *et al.*, 2010]. Pasikartojimo rizika gimti ĮŠY turinčiam vaikui didėja, jeigu šeimoje jau yra šeimos narių (sibsas ar vienas iš tėvų), turinčių ĮŠY [Øyen *et al.*, 2010; Peyvandi *et al.*, 2014]. Brodwall su kolegomis nustatė, kad tirtoje populiacijoje bendra ĮŠY pasikartojimo rizika, kai šeimoje auga vyresnis ĮŠY turintis vaikas, yra 4,1 proc., palyginti su 1,1 proc. ĮŠY pasireiškimo rizika šeimose, kuriose vyresnis vaikas neturi ĮŠY. Pasikartojimo rizika tos pačios lyties dvyniams siekia 14 proc., skirtingos lyties dvyniams – 11,9 proc. [Brodwall *et al.*, 2017]. Kiti autoriai nurodo 3–9 proc. bendrą ĮŠY pasikartojimo riziką priklausomai nuo konkretaus ĮŠY tipo [Gill *et al.*, 2003; Øyen *et al.*, 2009a; Øyen *et al.*, 2009b]. Pasikartojimo rizika vaikams, kai vienas iš tėvų turi ĮŠY, yra didesnė nei sveikų tėvų (1–5 proc.). Ši rizika reikšmingai didėja (2–20 proc.), jei širdies ydą turi motina [Gill *et al.*, 2003].

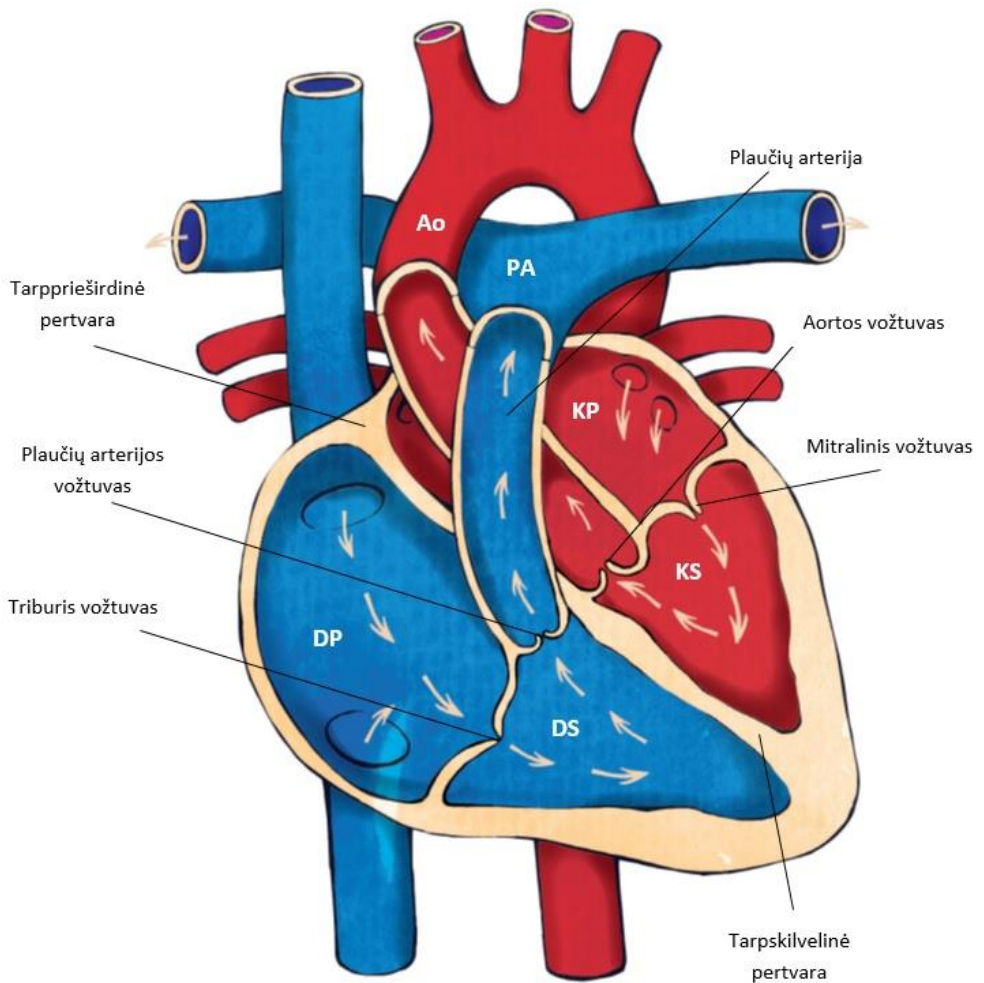
Pasikartojimo rizika šeimoje labai varijuoja priklausomai nuo ĮŠY tipo [Gill *et al.*, 2003; Blue *et al.*, 2012]. Obstrukcinių kairiosios pusės širdies ydų – hipoplastinės kairiosios širdies sindromo, aortos vožtuvo stenozės ir aortos koarktacijos – atveju būna kur kas didesnė pasikartojimo rizika sibsamams, palyginti su kitų tipų ĮŠY [Blue *et al.*, 2012]. Fenotipinis konkordantiškumas pasikartojančių ĮŠY fenotipų, t. y. toks pats ĮŠY tipas vienos šeimos nariams,

yra 3 proc., o laterališkumo ir izoliuotų atrioventrikulinės pertvaros ydų atvejais atitinkamai siekia 64 proc. ir 80 proc. [Gill *et al.*, 2003]. Ellesøe su kolegomis analizavo širdies ydos pasikartojimo modelius 1 163 šeimose su ĮŠY anamneze ir nustatė, kad šeiminiams ĮŠY būdingi specifiniai ligos pasikartojimo modeliai, nulemti bendro poveikio genetiškai reguliuojamų vystymosi mechanizmų ir didesnę ĮŠY riziką lemiančių genų [Ellesøe *et al.*, 2017].

Geografiškai stebimas labai panašus ĮŠY pasireiškimo dažnis skirtingose šalyse. Kai kurių ĮŠY tipų dažnis skiriasi tarp populiacijų [Botto *et al.*, 2001; Nembhard *et al.*, 2010; van der Linde *et al.*, 2011; Gilboa *et al.*, 2016; Knowles *et al.*, 2017]. Keletas tyrimų parodė didesnę ĮŠY dažnį geografiškai ir religiškai uždaroje populiacijose, kurioms būdingas imbridingas ir giminingos santuokos [Nabulsi *et al.*, 2003; Yunis *et al.*, 2006; Chehab *et al.*, 2007; Bittles, 2011; Shieh *et al.*, 2012]. Padidėjęs ĮŠY dažnis tokiose populiacijose įtikinamai įrodo, kad recesyvinės mutacijos lemia ĮŠY. Dėl imbridingo, mažinančio efektyvios populiacijos dydį, didėja ĮŠY lemiančių genetinių variantų skaičius vieno ar abiejų tėvų, o tai savo ruožtu didina oligogeninio ĮŠY paveldėjimo dažnį.

#### 2.4. Širdies morfogenezė

Širdis yra pirmasis organas, kuris susiformuoja ir pradeda funkcionuoti embriogenezės metu [Munoz-Chapuli and Perez-Pomares, 2010]. Širdis pradeda formotis maždaug trečią žmogaus embriono vystymosi savaitę, kai embriono mitybiniai poreikiai nepatenkinami vien tik difuzijos būdu [Vincent and Buckingham, 2010]. Normalios širdies schema pateikiama 2.1 paveiksle.



**DP** – Dešinysis prieširdis  
**DS** – Dešinysis skilvelis  
**KP** – Kairysis prieširdis  
**KS** – Kairysis skilvelis  
**Ao** – Aorta  
**PA** – Plaučių arterija

■ Arterinis kraujas  
■ Veninis kraujas

## 2.1 paveikslas. Normalios širdies schema

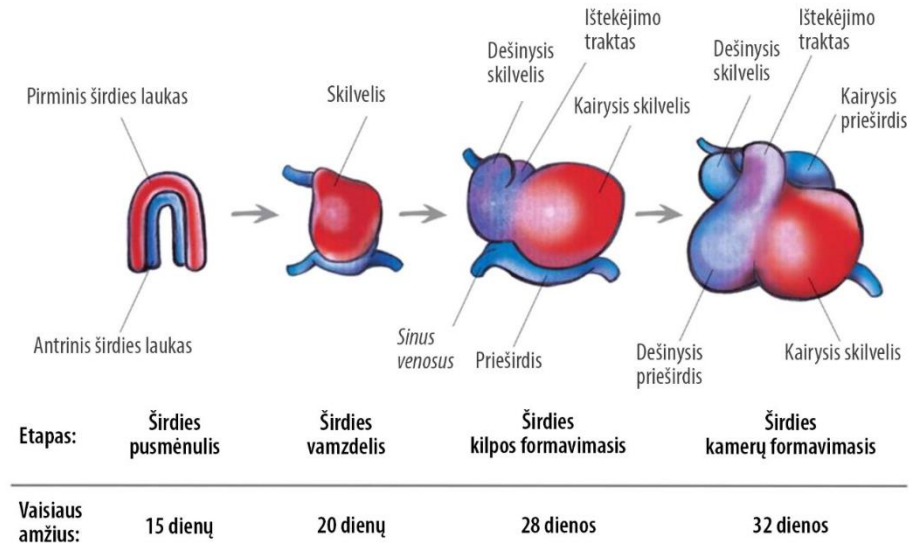
Netrukus po gastruliacijos iš anterolateralinės mezoderms plokštelės kilusios progenitorinės ląstelės migruoja per pirminę vagelę į kраниokaudalinę gemalinio disko dalį ir formuoja pusmėnulio formos sritį, vadinamą **pirminiu širdies lauku** (2.2 paveikslas). Šis procesas vyksta kaip atsakas į indukuojantį signalą, sklindantį iš endoderms [Schulthesis *et al.*, 1995]. Pagrindiniai šio etapo transkripcijos veiksniai yra NKX2-5, GATA4, MEF2 šeimos baltymai



ir SRF baltymas [McCulley and Black, 2012]. Šiame etape širdies morfogenezei taip pat svarbūs signalinių BMP, Wnt ir FGF kelių indukuojami signalai [Zaffran and Frasch, 2002; McCulley and Black, 2012].

Susiformavus pirminiam širdies laukui, medialinėje ir ventralinėje pirminio lauko dalyse išsidėsčiusios progenitorinės ląstelės formuoja **antrinį širdies lauką** [Bajolle *et al.*, 2009]. Dvidešimt pirmą embriono vystymosi dieną pirminio ir antrinio laukų ląstelės jungiasi išilgai ventralinės vidurio linijos ir formuoja pirminį širdies vamzdelį, sudarytą iš vidinio endokardo ir išorinio miokardo ląstelių sluoksnių, atskirtų ekstraląsteliniu matriksu [Schleich *et al.*, 2013]. Šiame etape transkripcijos veiksniai GATA4, GATA5, GATA6, MESP1, MESP2 ir TBX5 yra būtini taisyklingam širdies vystymuisi [Zaffran and Frasch, 2002; McCulley and Black, 2012]. Galutinė kardiomiocitų diferenciacija yra kontroliuojama signalinių BMP ir FGF kelių signalų [Zaffran and Frasch, 2002]. Iš pirminio širdies lauko formuojasi kairysis skilvelis, priekinė antrinio širdies lauko dalis yra dešiniojo skilvelio ir vėliau ištekėjimo trakto pirmtakas, o užpakalinė antrinio širdies lauko dalis – kairiojo ir dešiniojo prieširdžių pirmtakas [Meiuhac *et al.*, 2004; Vincent *et al.*, 2010] (2.2 paveikslas).

Ketvirtą embriono vystymosi savaitę formuojasi **širdies kilpa**, kai migruojant progenitorinėms ląstelėms ilgėja pirminis širdies vamzdelis (pirminio širdies vamzdelio elongacija) [Kelly, 2012; Anderson *et al.*, 2013a]. Širdies vamzdelis lenkiasi į dešinę pusę ir formuoja širdies kilpą [Kelly *et al.*, 2014; Kloesel *et al.*, 2016] (2.2 paveikslas). NKX2-5, SNAI1, PITX2, HAND1, HAND2, XIRP1, LEFTY1 ir LEFTY2 baltymai yra svarbūs širdies kilpos formavimosi reguliatoriai [Noseda *et al.*, 2011]. Širdies ištekėjimo traktas (angl. *outflow tract*) ir atrioventrikulinis kanalas juda link vidurio ir išsidėsto lygiagrečiai vienas kito atžvilgiu. Šis procesas vadinamas konvergencija. Paskutiniame širdies kilpos formavimosi etape (angl. *wedging*) ištekėjimo traktas, sukdamasis prieš laikrodžio rodyklę, perkelia būsimą aortos vožtuvo poziciją už plautinio kamieno ir, formuodamas proksimalinį (lot. *conus*) ir distalinį (lot. *truncus*) ištekėjimo trakto komponentus, padalija pirminius skilvelius ir ištekėjimo traktą į aortą ir plaučių arteriją [Kloesel *et al.*, 2016].



2.2 paveikslas. Ankstyvieji širdies vystymosi etapai (adaptuota iš Bruneau, 2008)

Širdies kilpos formavimasis yra pirmasis embriono organogenezės įvykis, kuris pasireiškia kairės – dešinės ašies asimetrija [Manner, 2000]. Šio proceso metu širdis susilenkia ir užima normalią poziciją kairėje krūtinės ląstos pusėje. Širdies kilpos formavimosi kryptis nustatoma asimetrine ašies signalinimo kaskada: SHH raiška per NODAL signalinį kelią aktyvina transkripcijos veiksnio PITX2 raišką mezodermoje, esančioje kairėje širdies vamzdelio pusėje [Srivastava, 2003; Tessari *et al.*, 2008]. PITX2 raiška kairėje širdies vamzdelio pusėje lemia asimetrinę organogenezę. LEFTY1 ir LEFTY2 baltymai yra NODAL antagonistai [Nosedá *et al.*, 2011]. Širdies kilpos formavimosi proceso sutrikdymas lemia širdies laterališkumo (kairės – dešinės pusių pusiausvyros) pažeidimą: dėl visiško kilpos apsvertimo širdis užima *situs inversus totalis* padėtį, o dalinis kilpos apsvertimas lemia neįprastą širdies padėtį, siejamą su heterotaksijos sindromu [Schleich *et al.*, 2013].

Ketvirtą – septintą savaitę vyksta pirminės širdies konformacijos pokyčiai, kai formuojasi keturių kamerų širdis (2.2 paveikslas). Prieširdžiai ir skilveliai vystosi ir diferencijuojasi pagal dorsoventralinę ir kairę – dešinę ašis. Atrioventrikulinio kanalo dalijimasis prasideda 28-ą embriono vystymosi dieną, kai pradeda formotis **tarpprieširdinė širdies pertvara**. Procesas prasideda, kai pirminė pertvara, *septum primum*, formuojasi link atrioventrikulinio kanalo ir palieka angą – *ostium primum*. Dėl ląstelių apoptozės kranialinėje dalyje atsiranda antroji anga – *ostium secundum* – arba

atvira ovalioji anga. Apie 33-ią dieną formuojasi antroji tarpširdinė pertvara, kuri glaudžiasi prie *ostium secundum* ir formuoja vožtuvą, leidžiantį embriono kraujui tekėti iš dešiniojo prieširdžio į kairįjį prieširdį. Po gimimo abi pertvaros suauga ir ovalioji anga užsidaro [Kloesel *et al.*, 2016].

**Tarpširdinė pertvara** formuojasi 35–40-ą dieną, kai ant atrioventrikulinio kanalo sienelių susidaro du endokardo sustorėjimai (angl. *endocardial cushions*) – viršutinis ir apatinis – juda vienas link kito, jungiasi ir formuoja pirminę tarpširdinę pertvarą. Tokiu būdu tarpširdinė pertvara padalija atrioventrikulinį kanalą į kairįjį ir dešinį atrioventrikulinius kanalus (40 diena). Atrioventrikuliniai vožtuvai vystosi šeštą – septintą vystymosi savaitę. Vidinėse kanalų dalyse šoninių atrioventrikulinių endokardo sustorėjimų mezenchiminės ląstelės proliferuoja ir formuoja atrioventrikulinius vožtuvus – mitralinį vožtuvą kairėje širdies pusėje ir triburį vožtuvą dešinėje širdies pusėje. Ištekėjimo traktą formuoja širdies stormuo (lot. *bulbus cordis*) ir arterinis kamienas (lot. *truncus arteriosus*). Šių struktūrų viduje spirale besiformuojanti pertvara padalija bendrą ištekėjimo traktą į plautinį kamieną ir aortą. Vėliau susiformuoja aortos ir plaučių arterijos vožtuvai [Kloesel *et al.*, 2016].

**Širdies laidžioji sistema** vystosi penktą embriono vystymosi savaitę. Pirmiausia pradeda formotis sinusinis mazgas, kuris pradžioje lokalizuojasi *sinus venosus* srityje, o vėliau – dešiniojo prieširdžio miokarde. Atrioventrikulinis mazgas susidaro virš endokardo sustorėjimų. Hiso pluoštas formuojasi iš atrioventrikulinio mazgo pluoštų, vėliau dalijasi į dešiniąją ir kairiąją kojųytes, kurios šakojasi ir pasibaigia Purkinje skaidulomis skilvelių miokardo subendokardiniame sluoksnyje. Šios skaidulos sąveikauja su skilvelių miokardu ir, perduodamos jam elektrinius impulsus, sukelia sinchroniškus abiejų skilvelių susitraukimus [Carey and Gelb, 2013]. Širdies laidžiosios sistemos vystymuisi svarbi HCN4, TBX5 ir PITX2 baltymų raiška [Ammirabile *et al.*, 2012; Schleich *et al.*, 2013].

**Kraujagyslių sistema** formuojasi iš pirminio širdies lauko. Apie 18-ą dieną aortos lankai (angl. *aortic arches*) vystosi iš aortos maišelio (angl. *aortic sac*), distaliausios *truncus arteriosus* dalies. Aortos lankai įsitvirtinę žiaunų lankų mezenchimoje ir baigiasi dešinėje ir kairėje dorsalinėse aortose. Aortos lankai atsiranda nuosekliai kraniokaudaline kryptimi. Penki poriniai lankai numeruojami I, II, III, IV ir VI (penkta pora visiškai nesusiformuoja arba nevisiškai susiformuoja ir greitai regresuoja). Iš jų vystosi viršutinio žandikaulio arterijos (I), poliežuvinė ir kilpinė arterijos (II), bendra miego arterija ir pradinė vidinių miego arterijų dalis (III), aortos lankas (IV), dešinioji poraktikaulinė arterija (IV dešinioji pusė), kairioji plaučių arterija ir

*ductus arteriosus* (VI kairioji pusė), ir dešinioji plaučių arterija (VI dešinioji pusė) [Kloesel *et al.*, 2016].

Širdies vainikinės arterijos vystosi iš dviejų pirmtakų – iš *sinus venosus* kilusių angioblastų ir epikardo progenitorinių ląstelių. Po indukcijos epikardo ląstelės virsta mezenchimos ląstelėmis, kurios savo ruožtu yra širdies vainikinių arterijų ląstelių pirmtakės [Sadler and Langman, 2012]. Širdies vainikinių arterijų endotelio ląstelės „įauga“ į aortą ir susijungia su ja. Širdis galutinai susiformuoja 50-ą embriono vystymosi dieną [Kloesel *et al.*, 2016], tačiau širdies brendimo procesas vyksta iki pat gimimo.

## 2.5. ĮŠY klasifikacija

Dėl kardiologinių fenotipų įvairovės ir jų kompleksinio pasireiškimo yra sudėtinga klasifikuoti ĮŠY. Akivaizdu, kad viena klasifikacija negalima aiškiai apibrėžti ĮŠY kompleksiskumo ir daugialypiškumo. Skiriamos kelios skirtingais aspektais grindžiamos ĮŠY klasifikacijos:

- anatomicinės, kurios remiasi širdies anatomicine struktūra. Tai plačiausiai taikomos klasifikacijos, naudojamos tiek klinikiniame kontekste, tiek ir sudarant ĮŠY registrus. Nors anatomicinės klasifikacijos neatspindi širdies ydų sudėtingumo, jos yra patogios skirtingiems tyrimams ar registrams palyginti. Šiuo metu pasaulyje naudojamos dvi klasifikacijos ir kodavimo sistemos: TLK-10-AM [<http://ebook.vlk.lt/e.vadovas/>] ir Tarptautinė pediatriinių ir įgimtų širdies ydų nomenklatūra (angl. *International Paediatric and Congenital Cardiac Code (IPCCC)*) [Franklin *et al.*, 2008];
- alternatyvi anatomicinei klasifikacijai yra embriologinė arba vystymosi klasifikacija, skirta antenatalinei ĮŠY diagnostikai ir apibūdinimui [Leung *et al.*, 1999];
- fiziologinė klasifikacija grupuoja ĮŠY pagal svarbiausius fiziologinius padarinius, pvz., cianotinės ĮŠY apibūdinamos maža deguonies koncentracija arteriniame kraujyje, palyginti su kitomis ĮŠY [White, 2009];
- klasifikacija, kuri remiasi klinikinio pasireiškimo ir / ar chirurginių intervencijų radiniais. Patomorfologinė klasifikacija, pasiūlyta Clark, apima šešis priežastinius ĮŠY mechanizmus: 1) ektomezenchiminio audinio migracijos defektus, 2) anomalią kraujo tėkmę širdies viduje, 3) ląstelės apoptozės defektus, 4) ekstraląstelinio matrikso defektus, 5) anomalų širdies anatominių struktūrų formavimąsi, 6) anomalią širdies padėtį ir netaisyklingą kilpos formavimąsi [Clark, 1986].

Šiame darbe naudota Anderson su kolegomis pasiūlyta patomorfoliginė IŠY klasifikacija [Anderson *et al.*, 2013b], apimanti keturias širdies ydų morfologines grupes (2.1 lentelė).

2.1 lentelė. Patomorfoliginė IŠY klasifikacija [Anderson *et al.*, 2013b]

IŠY morfologinė grupė	IŠY tipas
<b>I. IŠY su normaliomis širdies segmentinėmis jungtimis</b>	<b>Pertvarų defektai</b>
	Prieširdžių pertvaros defektas
	Skilvelių pertvaros defektas
	<b>Atrioventrikulinės pertvaros defektai</b>
	Visiška atrioventrikulinė komunikacija
	<b>Atrioventrikulinių vožtuvų anomalijos</b>
	Dviburio (mitralinio) vožtuvo nesandarumas
	Triburio vožtuvo nesandarumas
	<b>Stambiųjų arterijų vožtuvų anomalijos su / be skilvelių išvaymo trakto obstrukcija</b>
	Aortos vožtuvo anomalijos
Plautinės arterijos vožtuvo anomalijos	
Plautinės arterijos stenozę	
	<b>Fallot tetradą</b>
<b>II. IŠY su nenormaliomis širdies segmentinėmis jungtimis</b>	<b>Funkciškai vieno skilvelio širdis:</b>
	Triburio vožtuvo atrezija
	Kairiojo skilvelio hipoplazija
	<b>Stambiųjų kraujagyslių transpozicija</b>
	<b>Dvigubas ištekėjimas iš skilvelio</b>
<b>III. Stambiųjų kraujagyslių anomalijos</b>	<b>Bendras arterinis kamienas</b>
	Sisteminių venų anomalijos
	Plaučių venų anomalijos
	Aortos anomalijos
	Plaučių arterijos anomalijos
<b>IV. Širdies padėties anomalijos</b>	Atviras arterinis latakas
	Heterotaksija
	L kilpa
	Dekstrokardija

## 2.6. IŠY fenotipai ir jų molekulinė patogenezė

Šimtai IŠY fenotipų ir jų anatominų požymių yra klasifikuojami įvairių klasifikacijos sistemų. Šiame skyriuje trumpai apibūdinami IŠY tipai. Vienos

ĮŠY yra dažniau pasitaikančios, nesudėtingos arba vidutinio sunkumo, kitos – retos, tačiau sunkios.

**Skilvelių pertvaros defektas (SPD)** – skilvelių pertvaroje esanti anga (šuntas). Tai dažniausia širdies yda, sudaro apie 50 proc. visų ĮŠY. SPD yra skirstomas į membraninį, kai nustatoma netoli *AV annulus*, ir raumeninį. SPD gali pasireikšti kaip izoliuota širdies yda arba būti kartu su kitomis širdies ydomis. Genetiškai SPD yra heterogeniškas, nulemtas mutacijų keliuose genuose: *CITED2*, *GATA4*, *NKX2-5* [Sperling *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2012] (2.3 paveikslas).

**Prieširdžių pertvaros defektas (PPD)** – prieširdžių pertvaroje esanti anga (šuntas). PPD yra viena iš dažniausių ĮŠY, nustatomas apie 9,8 proc. ĮŠY turinčių pacientų. PPD gali būti izoliuota širdies yda arba nustatoma kartu su kitomis širdies ydomis. PPD lemia *GATA4*, *NKX2-5* ir *MYH6* genų mutacijos [Schott *et al.*, 1998; Garg *et al.*, 2003; Ching *et al.*, 2005] (2.4 paveikslas).

**Atrioventrikulinės pertvaros komunikacija (AVK)** – širdies ydos, atsirandančios dėl sutrikusio susijungimo viršutinio ir apatinio endokardo sustorėjimų. Dėl šios priežasties formuojasi prieširdžių pertvaros ir skilvelių pertvaros defektai bei anomalios atrioventrikulinių vožtuvų burės. AVK sudaro 4–5 proc. visų ĮŠY [Hoffman *et al.*, 2004; Reller *et al.*, 2008]. Tačiau šios anomalijos daug dažniau nustatomos prenataliai ir diagnozuojamos 18 proc. vaisių su širdies ydomis [Allan *et al.*, 1994]. Postnataliai, tam tikrų pacientų grupių yra didesnis AVK dažnis, pvz., *Down* sindromo atveju AVK sudaro 39 proc. nustatytų visų širdies anomalijų [Freeman *et al.*, 2008]. Nesindrominiais AVK atvejais buvo nustatytos funkcijos praradimo mutacijos *TBX5*, *GATA4*, *CRELD1*, *BMPR2*, *GDF1*, *ALK2* genuose, dalyvaujančiuose širdies embriogenezėje [Basson *et al.*, 1999; Garg *et al.*, 2003; Robinson *et al.*, 2003; Roberts *et al.*, 2004; Karkera *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2009]. Šeimų su AVK atvejais genetiniai tyrimai įrodė *NR2F2* geno retų šeiminių patogeninių variantų svarbą AVK atsirasti [Al Turki *et al.*, 2014] (2.5 paveikslas).

**Kairiosios širdies hipoplazijos sindromas (KŠHS)** – viena iš sunkiausių įgimtų širdies ydų, būna 1 iš 5 000 naujagimių. KŠHS yra širdies anomalijų kompleksas, kurį sudaro kairiosios širdies struktūros (mitralinio ir aortos vožtuvų, kairiojo skilvelio, kylančiosios aortos) hipoplazijos, stenozės arba atrezijos derinys. Negydant chirurginiu būdu mirštamumas pirmaisiais gyvenimo metais daugiau nei 90 proc. [Tarutis *et al.*, 2007]. KŠHS lemia *GJA1*, *NKX2-5*, *NOTCH1*, *HAND1*, *FOXC2* ir *FOXL1* genų mutacijos [Dasgupta *et al.*, 2001; Stallmeyer *et al.*, 2010; Iascone *et al.*, 2012]. Naujausių tyrimų duomenimis, KŠHS yra poligeninės etiologijos širdies yda,

atsirandanti dėl pakitusių *PCDHA* ir *SAPI30* genų sinergetinės sąveikos [Liu *et al.*, 2017] (2.6 paveikslas).

**Tetradą Fallot (TF)** – dažniausiai pasitaikanti cianotinė širdies yda, kurią sudaro keturi struktūriniai defektai: skilvelių pertvaros defektas, plaučių arterijos stenozė, aortos dekstrapozicija ir dešiniojo skilvelio hipertrofija. TF apima apie 7–10 proc. visų ĮŠY atvejų [Bédard *et al.*, 2009]. Apie 16 proc. TF atvejų susiję su kitais širdies struktūriniais ar kraujagysliniais sutrikimais, galinčiais turėti įtakos klinikiniam TF pasireiškimui [Bailliard and Anderson, 2009]. Dažniausiai su TF asocijuoti struktūriniai širdies pakitimai yra aortos šaknies išsiplėtimas (40 proc.), periferinė plautinio kamieno stenozė (28 proc.), aortos lanko anomalijos (25 proc.), antriniai prieširdžių pertvaros defektai (20 proc.). Kraujagyslių pakitimai, galintys pasireikšti su TF, yra vainikinių arterijų (15 proc.), kairiosios viršutinės tuščiosios venos (11 proc.) ar aortopulmoninių kolateralijų (10 proc.) anomalijos [Changela *et al.*, 2010]. Nors TF embriono vystymosi mechanizmai yra gerai ištirti, molekulinė patogenezė vis dar nėra galutinai aiški. Izoliuotas TF lemia *NKX2-5* [Benson *et al.*, 1999; Goldmuntz *et al.*, 2001], *GATA4* [Salazar *et al.*, 2011], *GATA5* [Huang *et al.*, 2014], *JAG1* [Eldadah *et al.*, 2001; Bauer *et al.*, 2010], *ZFPM2* (*FOG2*) [Pizzuti *et al.*, 2003], *GDF1* [Karkera *et al.*, 2007] genų mutacijos. Apie 15 proc. TF siejama su 22q11 mikrodelecijos sindromu, kurį lemia 22q11.2 srities delecija [Lu *et al.*, 2001]. TF taip pat siejama su aneuploidijų sindromais – apie 3 proc. *Down* sindromo širdies ydų sudaro TF [Stoll *et al.*, 2015] (2.7 paveikslas).

**Dvigubas ištekėjimas iš dešiniojo skilvelio (DIDS)** – cianotinė širdies yda, kuriai būdinga netaisyklinga abiejų stambųjų kraujagyslių (aortos ir plaučių arterijos) kilmė iš dešiniojo skilvelio (2.8 paveikslas). DIDS dažniausiai asocijuotas su SPD, kuris varijuoja dydžiu ir lokalizacija ir lemia ydos sunkumą. DIDS sudaro 1–3 proc. visų ĮŠY ir dažniausiai būna su 13 ir 18 chromosomų trisomijų bei 22q11.2 delecijos sindromais. Nesindrominiais DIDS atvejais buvo nustatytos *CFC1* [Selamet Tierney *et al.*, 2007] ir *CRX* [McElhinney *et al.*, 2003] genų mutacijos.

**Aortos koarktacija (AoKo)** – aortos nusileidžiančios dalies susiaurėjimas, kuris dažniausiai lokalizuotas šalia kairiosios poraktikaulinės arterijos atšakojimo prie atviro arterinio latako (2.9 paveikslas). AoKo apima 5–8 proc. visų ĮŠY. Yda gali būti izoliuota, bet dažnai ji pasireiškia kartu su kitomis širdies ydomis. AoKo gali būti vienas iš *Turner* sindromo ir *Kabuki* sindromo klinikinių požymių. AoKo dažnis *Turner* sindromo atveju 7–18 proc. [Völkl *et al.*, 2005], o esant *Kabuki* sindromui – 23 proc. [Digilio *et al.*, 2001b]. Moosmann su kolegomis parodė, kad KSP lytinėse chromosomose yra reikšmingi nesindrominių AoKo etiologijoje [Moosmann

*et al.*, 2015]. Dideli KSP, esantys sergančių vyrų X chromosomoje, leidžia daryti prielaidą, kad lytinių chromosomų aberacijos ne tik dalyvauja sindrominių AoKo vystymesi, bet ir lemia sporadines ir nesindromines AoKo. Šie genominiai pokyčiai koreliuoja su ydos pasireiškimo dažniu vyrų ir moterų populacijose santykiu 2:1 atitinkamai. Vyrų negali kompensuoti vienoje X chromosomoje esančių genų dozės pokyčių.

**Stambiųjų kraujagyslių transpozicija (SKT)** – įgimta širdies yda, kuriai būdinga diskordantinė ventrikuloarterinė jungtis, kai aorta susijungusi su dešiniuoju skilveliu, o plaučių arterija – su kairiuoju. Esant šiai ydai susidaro du nesusisiekiantys kraujo apytakos ratai. SKT yra nesuderinama su gyvybe, jei nėra jungčių tarp šių kraujo apytakos ratų. Tokiomis jungtimis gali būti atvira ovalioji anga, atviras arterinis latakas, prieširdžių arba skilvelių pertvaros defektas [Jonavičius *et al.*, 2014]. Chirurginis gydymas pacientui reikalingas pirmosiomis savaitėmis po gimimo. SKT sudaro 5–7 proc. visų ĮŠY atvejų. Ši yda yra dažniausia cianotinė ĮŠY (60–70 proc.). Ji gali pasireišti kaip izoliuotas įgimtas raidos defektas arba būti sindromo dalimi [Digilio *et al.*, 2001a]. Berniukai serga dažniau nei mergaitės (santykis 2:1). Nustatyta, kad nesindromines SKT lemia širdies laterališkumo genų *CFC1*, *NODAL*, *ZIC3* bei *SMAD2* geno mutacijos [Unolt *et al.*, 2013] (2.10 paveikslas).

**Atviras arterinis latakas (AAL)** – įgimta širdies yda, kai vaisiaus kraujagyslė, jungianti aortą su plaučių arterija, lieka funkcionuoti po gimimo. Nėštumo laikotarpiu ši kraujagyslė yra svarbi vaisiaus kraujotakai, nes per ją kraujas patenka iš placentos į vaisiaus organizmą. Po gimimo, padidėjus spaudimui plaučiuose, latakas susitraukia, vėliau užanka. AAL yra viena iš dažniausių širdies ydų, būna 1 iš 2 000 naujagimių ir sudaro 5–10 proc. visų ĮŠY. Gerokai didesnis AAL dažnis neišnešiotų naujagimių grupėje ir priklausomai nuo diagnostinių kriterijų siekia 20–60 proc. Kai kurių geninių sindromų – *Mowat–Wilson (SMADIP1)*, *Loeys–Dietz (TGFBRI/2)*, *Noonan (PTPN11)*, *Holt–Oram (TBX5)*, *Rubinstein–Taybi (CREBBP)*, *DiGeorge (TBX1)*, periventrikulinės heterotopijos (*FLNA*), *Cantu (ABCC9/KCNJ8)* ir *Char (TFAP2B)* – atveju AAL gali būti sindromo dalimi [Lewis *et al.*, 2018]. AAL lemia ir lygiųjų raumenų genų *MYH11* ir *ACTA2* mutacijos [Zhu *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2007] (2.11 paveikslas).

**Ebstein anomalija (liet. Ebšteino anomalija) (EB)** – reta įgimta širdies yda, pasitaiko 1 iš 200 000 naujagimių ir sudaro 0,5–0,8 proc. visų ĮŠY [Engelen *et al.*, 2013]. Šiai ydai būdingas netaisyklingas triburio vožtuvo burių prisitvirtinimas, kai triburis vožtuvas pasislenka žemyn link dešiniojo skilvelio sienelės. Tai lemia dešiniojo prieširdžio padidėjimą bei dešiniojo skilvelio neišsivystymą ir funkcijos sutrikimą. Dauguma pacientų su EB turi PPD ar AOA, rečiau nustatomos kitos širdies anomalijos – DAV, SPD ar PAS



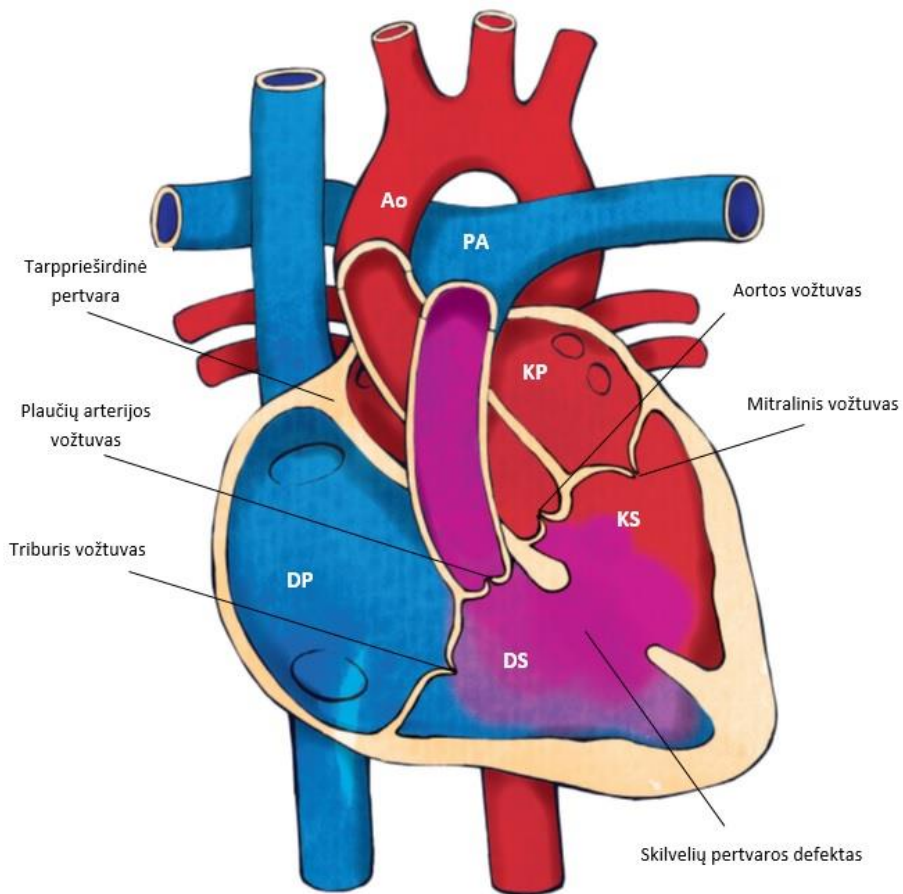
[Frescura *et al.*, 2000; Attenhofer *et al.*, 2007]. EB siejama su heterozigotinėmis *MYH7* geno mutacijomis [Engelen *et al.*, 2013] (2.12 paveikslas).

**Aortos stenozė (AoS)** – aortos angos susiaurėjimas, trukdantis kraujui tekėti iš kairiojo skilvelio į aortą. Aortos stenozė yra dažna širdies yda, jos dažnis 3–5 proc. visų IŠY. Skiriami trys AoS tipai pagal susiaurėjusios dalies lokalizaciją – aortos vožtuvo stenozė, lemianti dviburio vožtuvo susidarymą, povožtuvinė aortos stenozė ir viršvožtuvinė aortos stenozė (2.13 paveikslas).

**Dviburis aortos vožtuvas (DAV)** apima apie 80 proc. visų AoS atvejų ir sudaro 1–2 proc. visų IŠY [Mordi and Tzemos, 2012]. Ši yda nepasireiškia ankstyvame amžiuje, tačiau gali būti svarbus bakterinio endokardito, vėlyvos pradžios aortos vožtuvo kalcifikacijos ar stenozės, aortos aneurizmos ir disekacijos rizikos veiksnys [Michelena *et al.*, 2008]. Su DAV siejamos *NOTCH1* ir *GATA5* genų mutacijos [Garg *et al.*, 2005; Bonachea *et al.*, 2014].

**Povožtuvinė aortos stenozė** susidaro dėl aortos susiaurėjimo žemiau vožtuvo esančioje srityje. **Viršvožtuvinė aortos stenozė** susidaro dėl susiaurėjusios ir displastiškos aortos dalies, esančios aukščiau vožtuvo. Šis AoS tipas sudaro apie 8–14 proc. visų AoS atvejų ir dažniausiai siejamas su *Williams* sindromu.

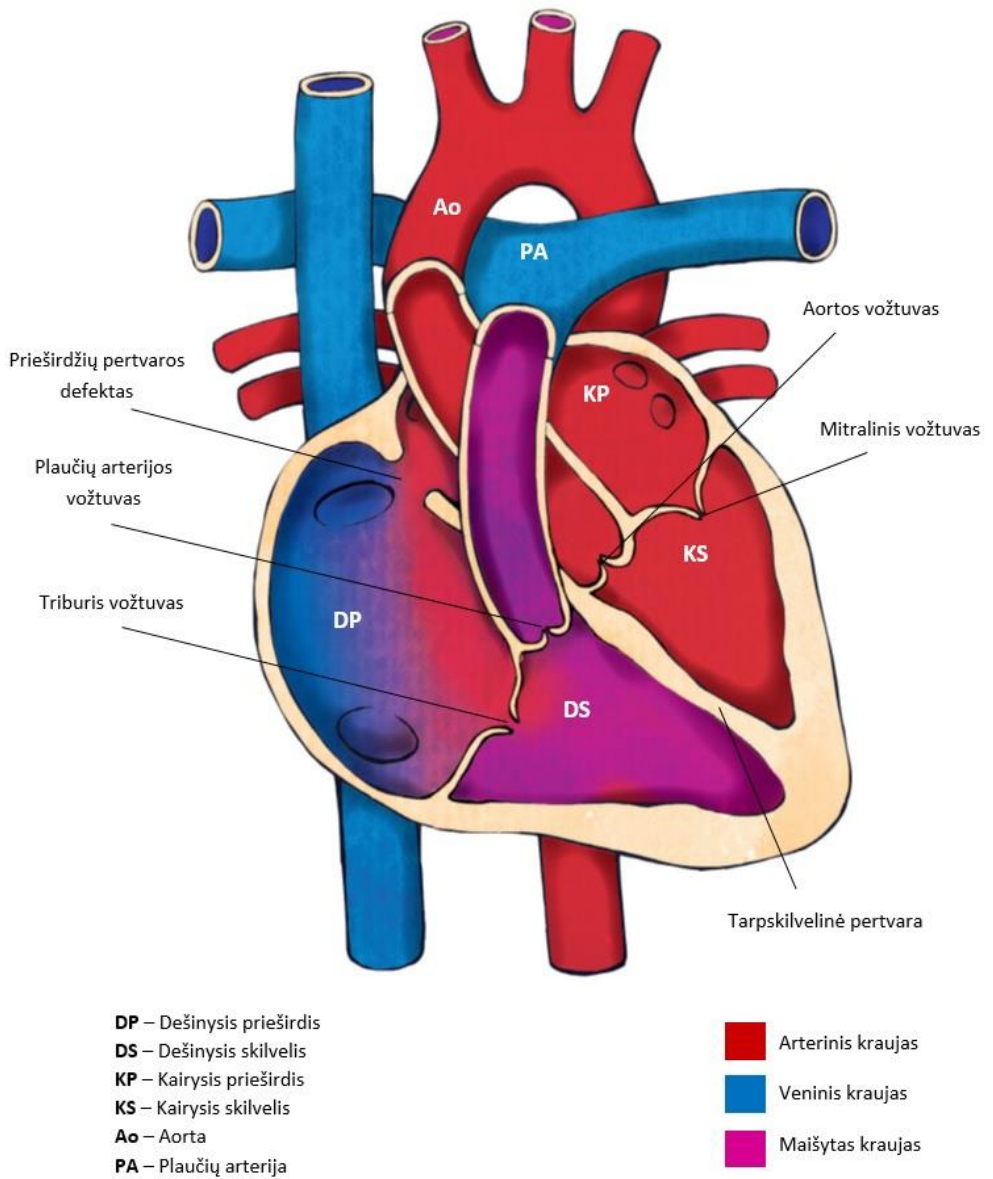
**Plaučių arterijos stenozė (PAS)** – plaučių arterijos susiaurėjimas, trukdantis kraujui tekėti iš dešiniojo skilvelio į plaučių arterijas. Pagal susiaurėjusios dalies lokalizaciją skiriami trys PAS tipai – povožtuvinė, plaučių arterijos vožtuvo stenozė ir viršvožtuvinė. **Plaučių arterijos vožtuvo stenozė (PAVS)** – plaučių arterijos vožtuvinės angos susiaurėjimas dėl netaisyklingai susiformavusio vožtuvo. Pagal dažnį PAVS antroje vietoje po pertvarų defektų. Yda gali būti izoliuota, pasireikšti su kitomis širdies ydomis ar genetiniais sindromais, tokiais kaip *Alagille* ir *Noonan* sindromai [Richards and Garg, 2010] (2.14 paveikslas).



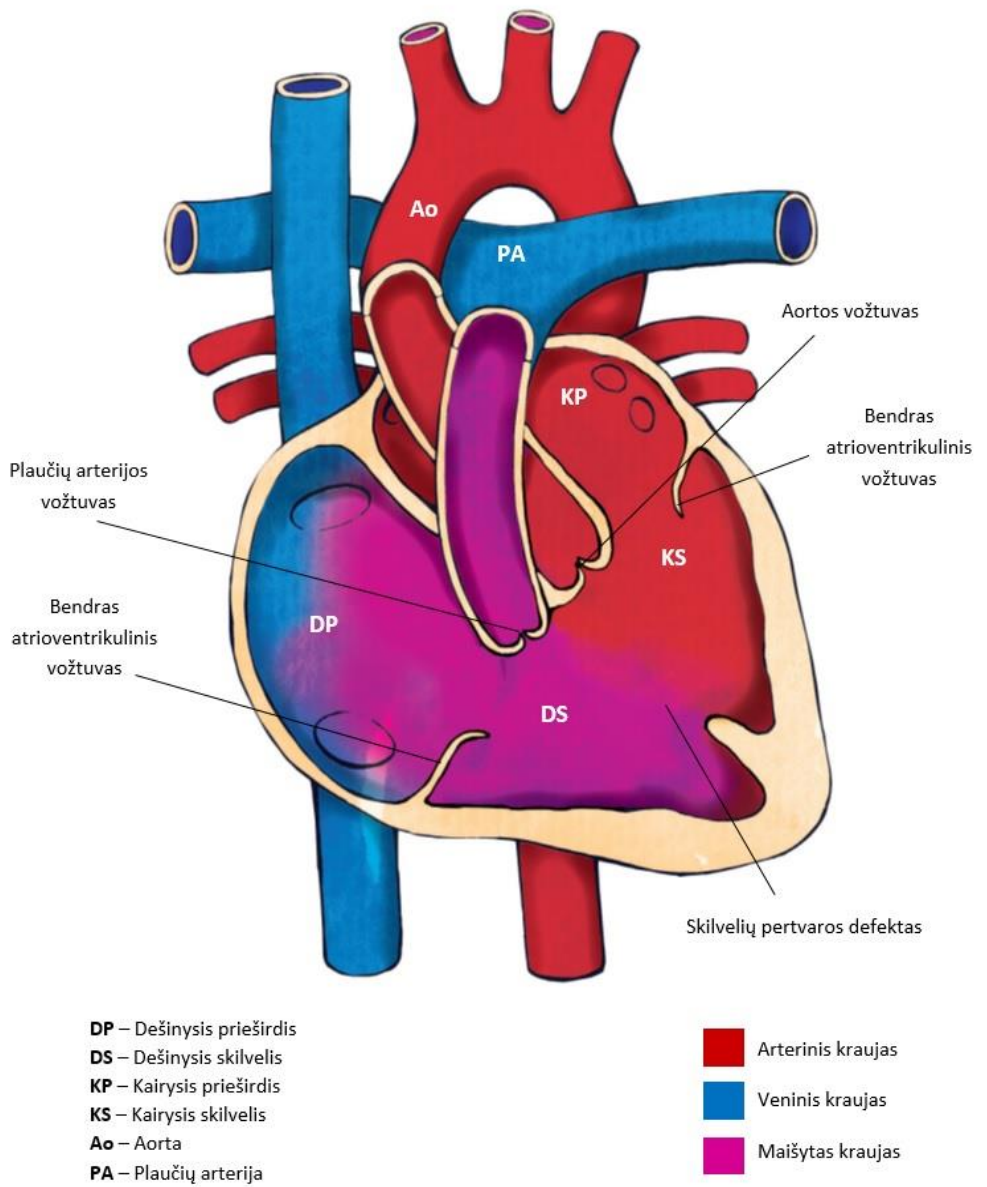
DP – Dešinysis prieširdis  
 DS – Dešinysis skilvelis  
 KP – Kairysis prieširdis  
 KS – Kairysis skilvelis  
 Ao – Aorta  
 PA – Plaučių arterija

■ Arterinis kraujas  
■ Veninis kraujas  
■ Maišytas kraujas

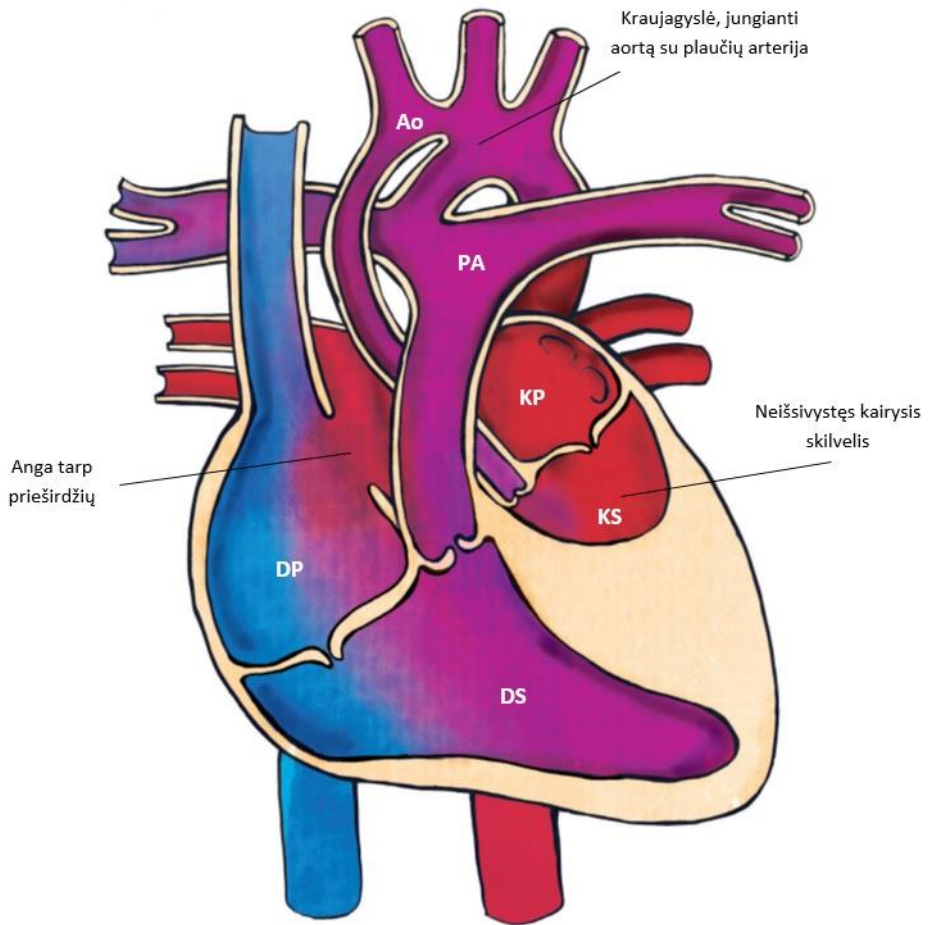
2.3 paveikslas. Skilvelių pertvaros defekto schema



2.4 paveikslas. Prieširdžių pertvaros defekto schema



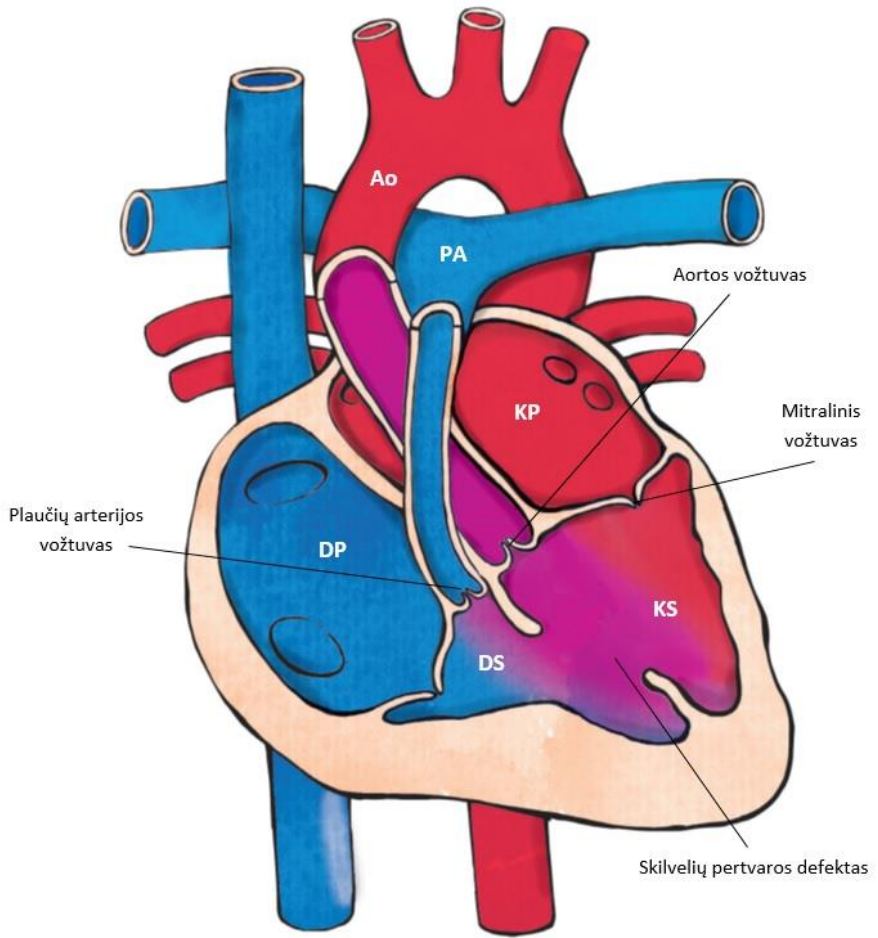
2.5 paveikslas. Atrioventrikulinės pertvaros komunikacijos schema



**DP** – Dešinysis prieširdis  
**DS** – Dešinysis skilvelis  
**KP** – Kairysis prieširdis  
**KS** – Kairysis skilvelis  
**Ao** – Aorta  
**PA** – Plaučių arterija

■ Arterinis kraujas  
■ Veninis kraujas  
■ Maišytas kraujas

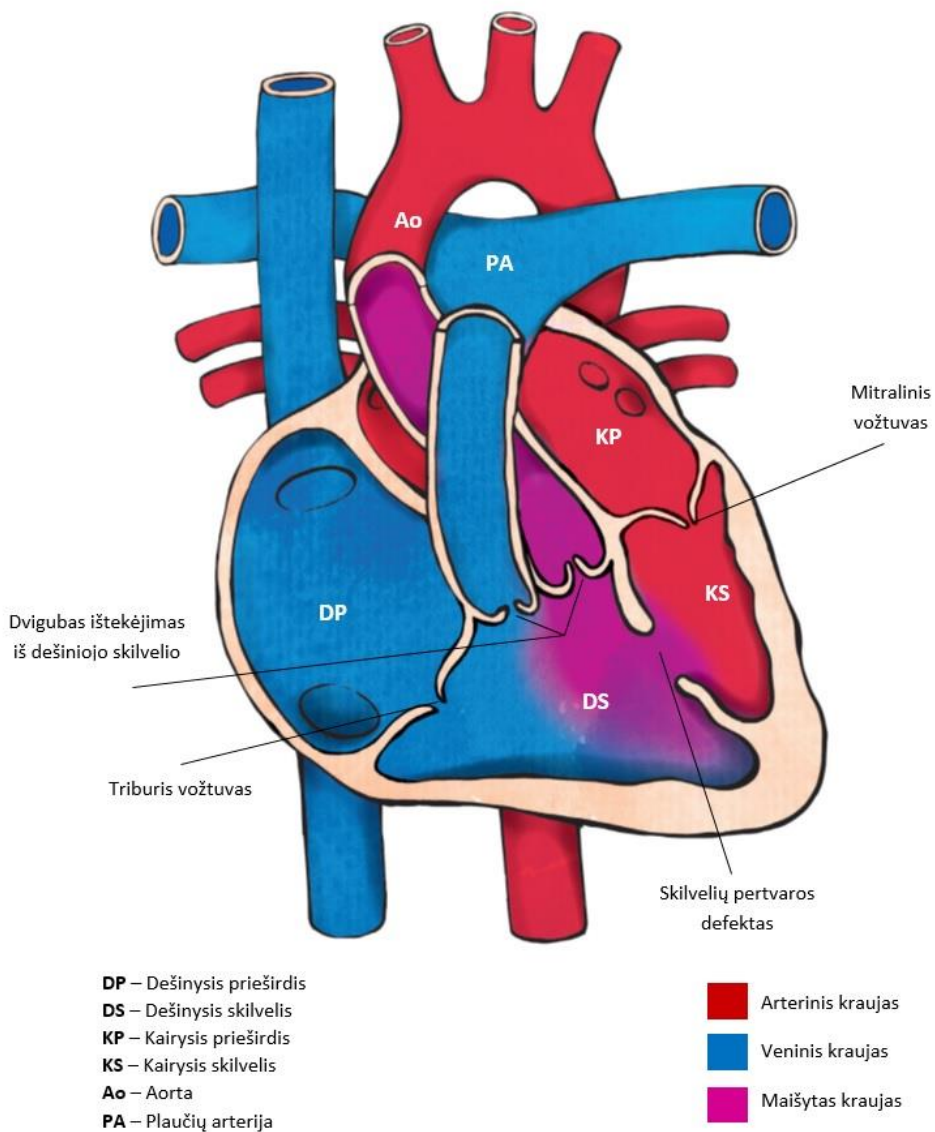
2.6 paveikslas. Kairiosios širdies hipoplazijos schema



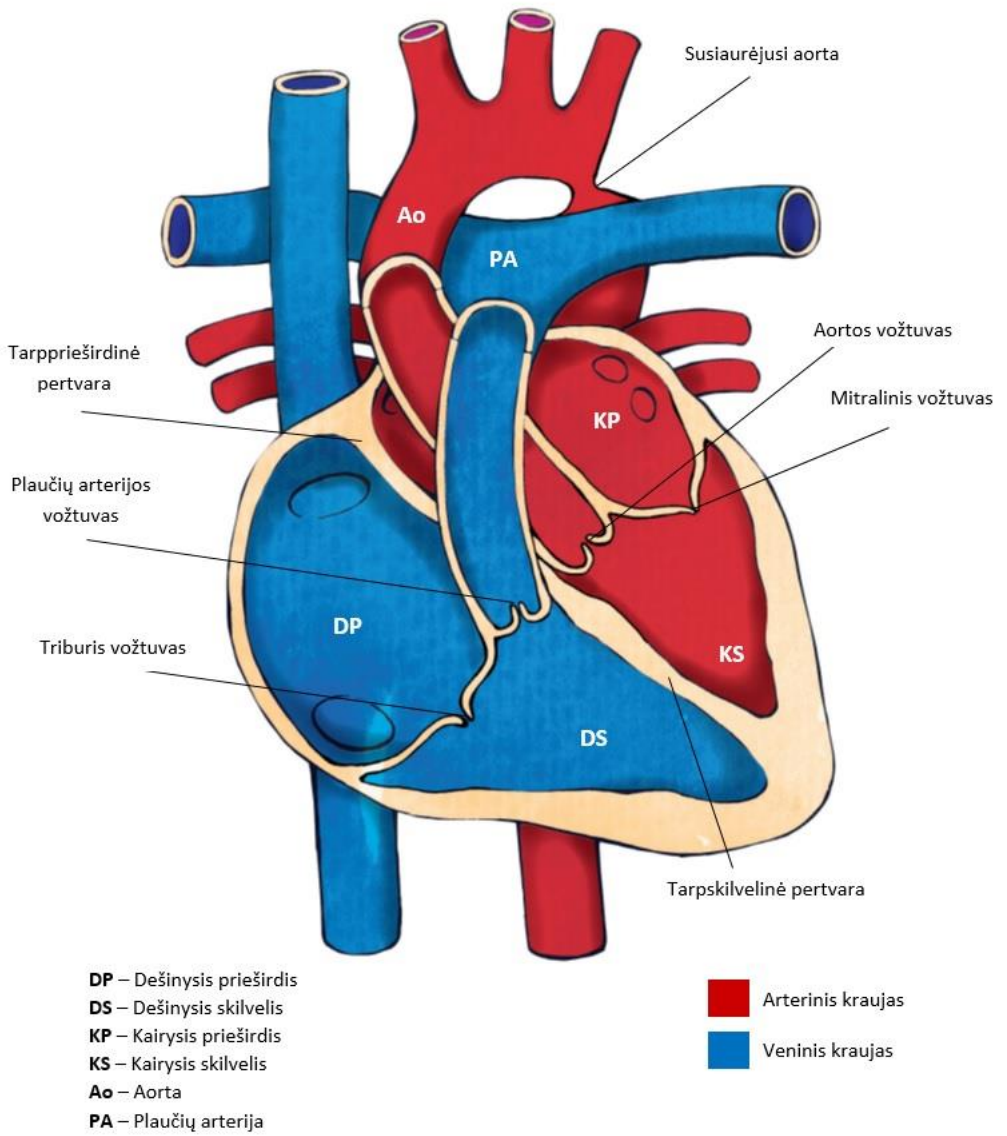
**DP** – Dešinysis prieširdis  
**DS** – Dešinysis skilvelis  
**KP** – Kairysis prieširdis  
**KS** – Kairysis skilvelis  
**Ao** – Aorta  
**PA** – Plaučių arterija

■ Arterinis kraujas  
■ Veninis kraujas  
■ Maišytas kraujas

2.7 paveikslas. Tetradą Fallot schema

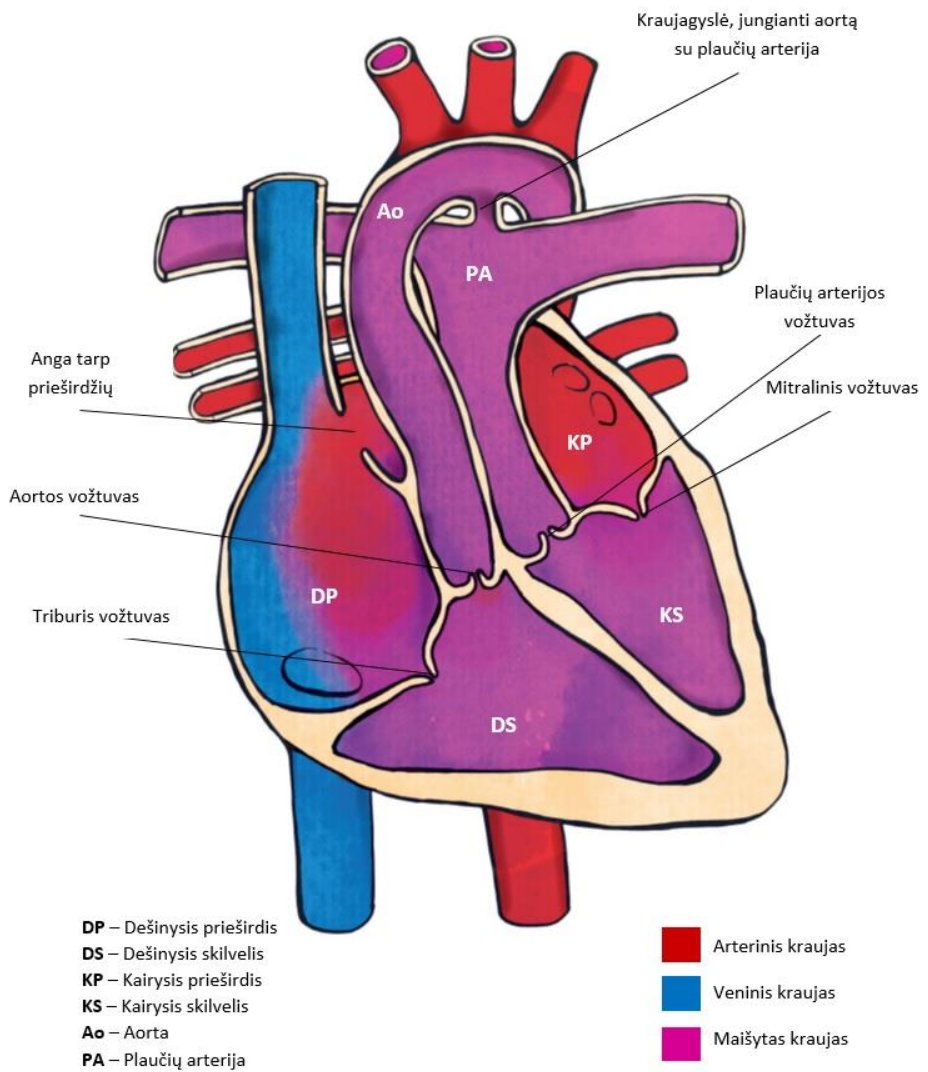


2.8 paveikslas. Dvigubo ištekėjimo iš dešinio skilvelio schema

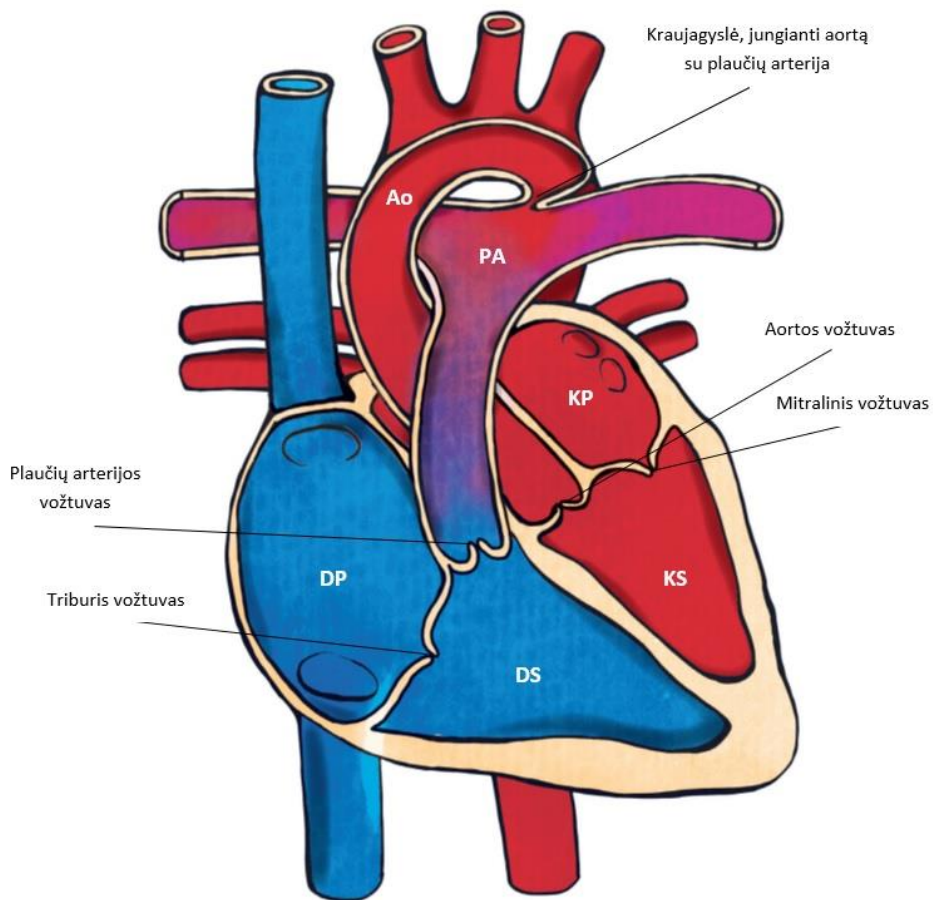


2.9 paveikslas. Aortos koarktacijos schema





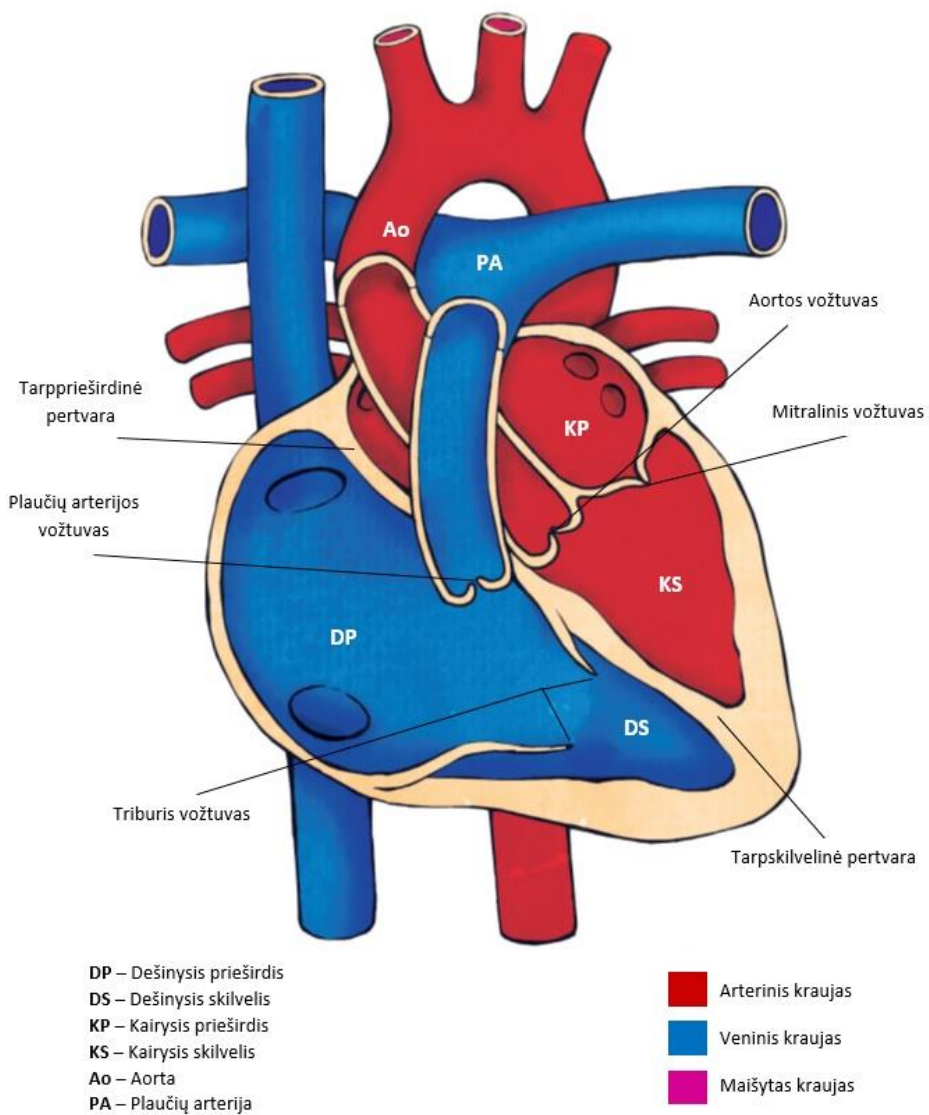
2.10 paveikslas. Stambiųjų kraujagyslių transpozicijos schema



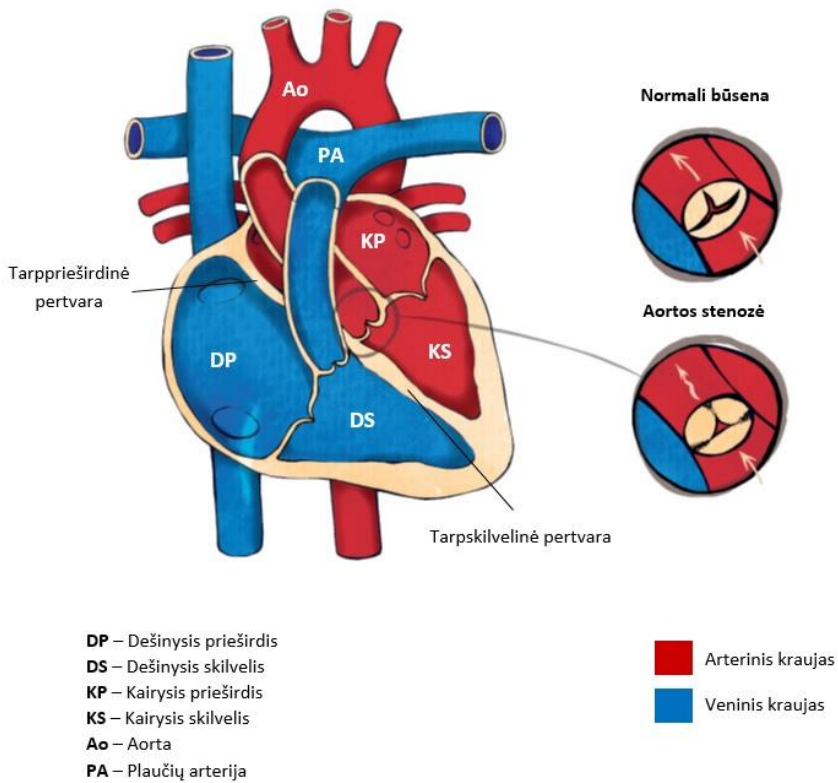
**DP** – Dešinysis prieširdis  
**DS** – Dešinysis skilvelis  
**KP** – Kairysis prieširdis  
**KS** – Kairysis skilvelis  
**Ao** – Aorta  
**PA** – Plaučių arterija

■ Arterinis kraujas  
■ Veninis kraujas  
■ Maišytas kraujas

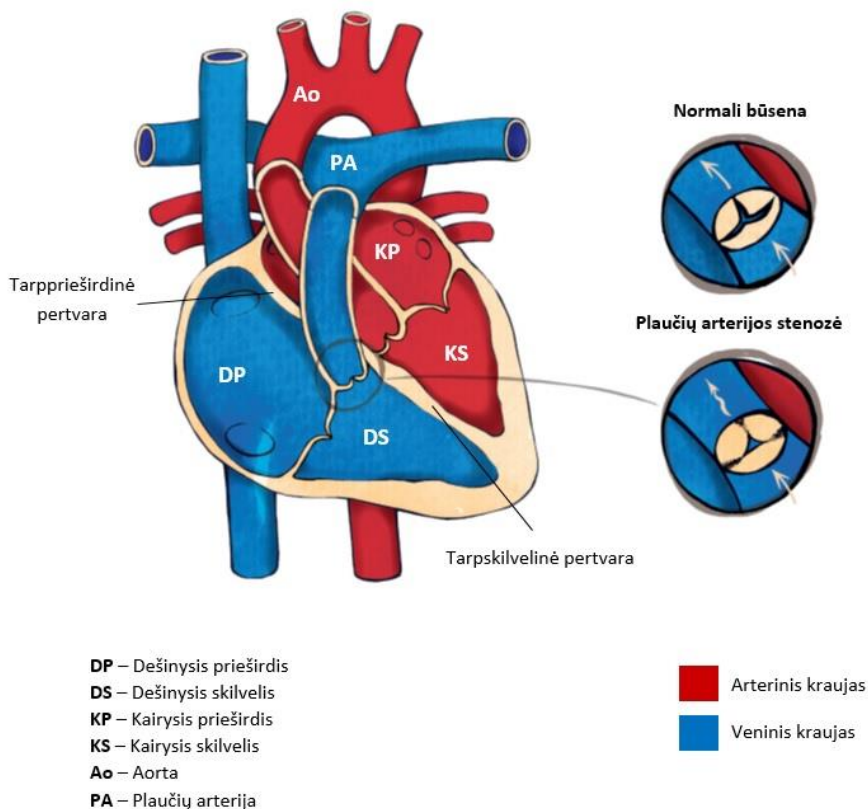
2.11 Atviro arterinio latako schema



2.12 *Ebšteino* anomalijos schema



2.13 Aortos stenozēs schema



## 2.14 Plaučių arterijos stenozės schema

### 2.7. Šiuolaikinė ĮŠY etiologijos samprata

#### 2.7.1. Negenetiniai rizikos veiksniai

Daugybė epidemiologinių tyrimų įrodytas negenetinių rizikos veiksnių poveikis ĮŠY etiopatogenezei. Dėl naujų mokslinių žinių buvo sukurtos ir įdiegtos prevencinės programos, pagal kurias būsimi tėvai konsultuojami dėl rizikos susilaukti sergančio vaiko. Mokslinėje literatūroje pateikiamos išsamios negenetinių veiksnių rizikos ĮŠY atsirasti apžvalgos [Jenkins *et al.*, 2007; Patel and Burns, 2013]. Negenetiniai veiksniai, didinantys širdies defektų atsiradimo riziką, skirstomi į kelias grupes:

- motinos būklės ir ligos – fenilketonurija, I tipo diabetas, sisteminės jungiamojo audinio ligos, skydliaukės ligos, epilepsija, raudonukės infekcija pirmąjį nėštumo trimestrą, arterinė hipertenzija, nerimo ir

nuotaikos sutrikimai [Levy *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2013; Øyen *et al.*, 2016];

- nėštumo metu vartojami medikamentai – antibiotikai, antiastminiai preparatai, aknės gydymo preparatai, pvz., izotretinoinas [Zomerdijk *et al.*, 2014]; antidepresantai – paroksetinas [Wurst *et al.*, 2010], sertralinas, priklausantis vadinamųjų selektyvių serotonino atgalinio sugrąžinimo į neuronus grupei [Wichman *et al.*, 2009]; nesteroidiniai priešūždegiminiai vaistai bei opioidiniai analgetikai [van Gelder *et al.*, 2011];
- nėštumo metu vartojamos teratogeninį poveikį turinčios medžiagos – alkoholis, rūkalai, narkotinės medžiagos [Mateja *et al.*, 2012];
- nėščiosios aplinkoje esantys sveikatai žalingi cheminiai junginiai – organiniai tirpikliai, herbicidai, pesticidai; padidėjusi anglies monoksido ir formaldehido koncentracija ore [Dulskienė ir Gražulevičienė, 2005; Dadvand *et al.*, 2011];
- motinos sociademografiniai rodikliai – motinos amžius  $\geq 40$  metų, apsunkinta akušerinė anamnezė, patirtas didelis stresas dėl artimo žmogaus mirties, skyrybų, prarasto darbo ir pan. [Liu *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2011; Tararbit *et al.*, 2011];
- tėvo sociademografiniai rodikliai – vyresnis tėvo amžius, alkoholio ir narkotinių medžiagų vartojimas [Materna-Kirylyuk *et al.*, 2009].

Epidemiologiniai tyrimai parodė, kad kai kurie negenetiniai rizikos veiksniai gali didinti visų ĮŠY tipų atsiradimo riziką, o kiti veiksniai siejami tik su konkrečiomis ĮŠY [Liu *et al.*, 2013]. Pavyzdžiui, motinos liga fenilketonurija gali didinti bet kurio tipo ĮŠY riziką [Levy *et al.*, 2001], o I tipo diabetas labiausiai siejamas su atrioventrikuline komunikacija [Ferencz *et al.*, 1993].

### 2.7.2. Genetiniai veiksniai

Pastarųjų dviejų dešimtmečių genetinių metodų pažanga suteikė galimybę tirti genetinę ĮŠY etiologiją. Dauguma ĮŠY yra daugiaveiksnių paveldėjimo ligos, kai ligos pasireiškimą lemia įvairios aplinkos veiksnių ir genetinių variantų sąveikos. Nors poligeninis modelis laikomas pagrindiniu paveldėjimo modeliu ĮŠY etiologijoje [Nora, 1968; Blue *et al.*, 2012], tam tikra ĮŠY dalis gali būti paaiškinama monogeniniu (kai ligą lemia vieno geno patogeniniai variantai) ar oligogeniniu (kai ligą lemia kelių genų patogeniniai variantai) paveldėjimo modeliais. Genetinė ĮŠY etiopatogenezė lemiamą ir vieno nukleotido variantų, ir sudėtinių genominių persitvarkymų. Šiuo metu

žmogaus genome nustatyta daugiau nei 50 genų, kurių mutacijos lemia ĮŠY, ir apie 500 genų identifikuota pelių modeliuose [Andersen *et al.*, 2014].

### 2.7.2.1. Sindrominės ĮŠY

Širdies ydos gali pasireikšti kaip sudedamoji dauginių vystymosi defektų dalis arba būti vienu iš sindromo požymių [Lander and Ware, 2014]. Apie 20 proc. ĮŠY turinčių naujagimių turi kitas įgimtas raidos anomalijas – kraniofacialinius defektus, kitų organų sistemų įgimtas anomalijas, raidos ir / ar augimo atsilikimą [Marino *et al.*, 2012; Andersen *et al.*, 2014; Lalani *et al.*, 2014; Azamian and Lalani, 2016]. Sindrominių širdies ydų genetinės priežastys varijuoja nuo didelių chromosomų aberacijų, apimančių daugybę genų, iki tam tikro geno vieno nukleotido mutacijos.

**Chromosomų persitvarkymai.** Rutiniiniu kariotipavimu nustatomi chromosomų persitvarkymai sudaro apie 10–13 proc. visų ĮŠY atvejų [Pierpont *et al.*, 2007; Hartman *et al.*, 2011; Fahed *et al.*, 2013] (2.2 lentelė). Dažniausi ĮŠY nulemiantys chromosominiai persitvarkymai yra chromosomų aneuploidijos (chromosomų skaičiaus pakitimai) ir chromosomų struktūros persitvarkymai (delecijos, duplikacijos), kurie pakeičia genetinės medžiagos kiekį genome ir nulemia patologiją dėl dozei jautrių genų efekto. Kiti chromosomų persitvarkymai – reciprokinės translokacijos, insercijos, inversijos – gali pertraukti geno seką chromosomų trūkio vietose arba pakeisti geno ir jo reguliacinių elementų sąveiką.

Viena iš dažniausių chromosominių patologijų, nustatomų ĮŠY turintiems pacientams, yra 21 chromosomos trisomija [Antonarakis *et al.*, 2004; Hartman *et al.*, 2011]. Apie 40–50 proc. pacientų su *Down* sindromu turi įgimtas širdies ydas, iš kurių dažniausios yra prieširdžių ir skilvelių pertvaros defektai ir atrioventrikulinės pertvaros defektas [Antonarakis *et al.*, 2004; Freeman *et al.*, 2008]. Širdies yda nustatoma 90 proc. *Patau* sindromo ir *Edwards* sindromo atvejų, tačiau dėl didelio pacientų su šiais sindromais mirtingumo abiejų sindromų ĮŠY sudaro apie 20 proc. šioje chromosominių persitvarkymų grupėje [Pont *et al.*, 2006]. Lytinių chromosomų persitvarkymai sudaro apie 3 proc. chromosominių persitvarkymų, nustatomų ĮŠY grupėje [Hartman *et al.*, 2011]. Širdies ydas turi 20–50 proc. pacienčių su *Turner* sindromu [Bondy, 2009].

ĮŠY yra vienas iš daugelio chromosomų mikrodelecijų ir mikroduplikacijų sindromų klinikinių požymių. Mikrodelecijų sindromams ir jų genetinėms priežastims nustatyti beveik du dešimtmečius buvo plačiai naudojamas molekulinis citogenetinis FISH metodas. ĮŠY turintiems pacientams dažniausiai nustatomas *DiGeorge* arba velokardiofacialinis

sindromas, dar vadinamas 22q11.2 delecijos sindromu [Donald-McGinn *et al.*, 2008; Ou *et al.*, 2008]. 22 chromosomos q11.21 srityje lokalizuotos mažo kopijų skaičiaus pasikartojimų sankaupos (*angl.* cluster of low-copy repeats – LCRs), vadinamas LCR22A-H, kuris yra meiotinės nealelinės homologinės rekombinacijos, lemiančios įvairaus dydžio delecijų ar duplikacijų susidarymą, tarpininkas. Dažniausia yra apie 3 Mb dydžio mikrodelecija, apimanti LCR22A-D sritį ir lemianti *DiGeorge* sindromą [Burnside, 2015]. *DiGeorge* sindromui būdingi dismorfiniai veido bruožai, ĮŠY, pažintinių funkcijų sutrikimas, užkrūčio ir prieskydinių liaukų hipoplazija / aplazija, hipokalcemija. 15 proc. tetrados Fallot (TF) atvejų nustatoma 22q11 mikrodelecija [Goldmuntz, 2005]. Genų kandidatų sekoskaita ir gyvūnų modeliai parodė, kad iš 30 genų, kuriuos apima 22q11 mikrodelecija, keičiasi tik vieno geno, *TBX1*, lemiančio daugiausia klinikinių požymių, dozė [Yagi *et al.*, 2003; Funato *et al.*, 2012].

Kiti mikrodelecijų sindromai taip pat siejami su širdies ydomis. *Williams-Beuren* sindromą lemia 7q11.23 srityje lokalizuota heterozigotinė 1,5–1,8 Mb mikrodelecija, apimanti apie 28 genus [Pober, 2010]. ĮŠY nustatoma 75 proc. pacientų, turinčių *Williams-Beuren* sindromą [Eronen *et al.*, 2002; del Pasqua *et al.*, 2009]. Viršvožtuvinę aortos stenozę lemia elastino geno *ELN* delecija, o sporadiniais ir šeiminiiais viršvožtuvinės aortos stenozės atvejais – taškinės *ELN* mutacijos [Metcalf *et al.*, 2000; Micale *et al.*, 2010]. Kiti klinikiniai šio sindromo požymiai yra specifiniai veido bruožai, psichomotorinės raidos atsilikimas, hiperkalcemija, savitai išreikštas draugiškumas [Pober, 2010].

*Wolf-Hirschhorn* sindromui būdinga dauginės vystymosi anomalijos ir intelektinė negalia. Šio sindromo genetinė priežastis – 4p16.3 delecija, kurios trūkio taškas varijuoja tarp 4p15.32 iki 4p16.3 genominių sričių. Apie 50 proc. pacientų turi širdies ydas – PPD, SPD, PAS arba AAL [Battaglia *et al.*, 2008].

Apie 15–20 proc. pacientų, kuriems yra *Cri-du-Chat* sindromas, pasireiškiantis mikrocefalija, dismorfiniais veido bruožais, kalbos raidos atsilikimu, intelektine negalia, specifiniu „katės kniaukimo“ verkimu kūdikystėje, turi širdies anomalijas – PPD, SPD arba AAL. *Cri-du-Chat* sindromą lemia 5 chromosomos trumpojo peties terminalinė arba intersticinė delecija. Terminalinių delecijų trūkio taškai varijuoja tarp 5p13 ir 5p15.2 genomo sričių [Mainardi *et al.*, 2001].



2.2 lentelė. Chromosominiai sindromai, susiję su IŠY [Fahed *et al.*, 2013; Blue *et al.*, 2012]

Sindromas/ chromosominė liga	Chromosominė patologija	Dažniausios IŠY	Dalis pacientų, turinčių IŠY (%)
<b>Autosomų ir lytinių chromosomų aneuploidijos</b>			
<b>8 chromosomos trisomijos mozaicizmas</b>	8 chromosomos trisomijos mozaicizmas	SPD, AAL, AoKo, PAS, TA	25
<b>9 chromosomos trisomija</b>	9 chromosomos trisomija	AAL, SPD, TF, DIDS	65 – 80
<i>Patau</i>	13 chromosomos trisomija	PPD, SPD, AAL, DIDS, TF, AoKo, KŠHS, SKT, AVK, VAPVD, dekstrokardija	80 – 100
<i>Edwards</i>	18 chromosomos trisomija	PPD, SPD, TF, AoKo, DIDS, KŠHS	61 – 100
<i>Down</i>	21 chromosomos trisomija	AVK, PPD, SPD, TF	44 – 50
<i>Turner</i>	X chromosomos monosomija	AoKo, AoS, KŠHS, DAPVI	20 – 50
<i>Klinefelter</i>	priedinė X chromosoma	PPD, AAL, MVN	50
<b>Mikrodelecijų sindromai</b>			
<i>Wolf-Hirschhorn</i>	4p16.3 delecija	AoA, AAL, PPD, SPD	50
<i>Cri-du-Chat</i>	5p15.2 delecija	SPD, AAL, PPD, TF	10 – 55
<i>Williams-Beuren</i>	7q11.23 delecija	SVAS, PAVS, PAS, PPAS	50 – 80
<i>DiGeorge/velokardiofacialis sindromas</i>	22q11.2 delecija	TF, PAL, TA, SPD, aortos lanko anomalijos	75 – 85

Sindromas/ chromosominė liga	Chromosominė patologija	Dažniausios ĮŠY	Dalis pacientų, turinčių ĮŠY (%)
<b>Chromosominiai pokyčiai</b>			
<b>8p delecijos sindromas</b>	8p delecija	AVK, PAS, SPD, TF	50 – 75
<b>10p delecijos sindromas</b>	10p delecija	SPD, PPD, AAL, PAS, AoKo, TA	50
<b>Jakobsen</b>	11q23 delecija	KŠHS, KSITD	>50
<b>Pallister-Killian</b>	12p tetrasomija	SPD, AoKo, AAL, PPD, AoS	25
<b>Cat Eye</b>	22q11 tetrasomija	VAPVD, DAPVĮ, TF	50 – 67

AoA – aortos atrezija, AAL – atviras arterinis latakas, AoKo – aortos koarktacija, AoS – aortos stenozė, AVK – atrioventrikulinė komunikacija, DAPVĮ – dalinis anomalus plaučių venų įtekėjimas, DAV – dviburis aortos vožtuvas, DIDS – dvigubas ištekėjimas iš dešiniojo skilvelio, EB – Ebšteino anomalija, KŠHS – kairiosios širdies hipoplazijos sindromas, KSITD – kairiojo skilvelio išstūmimo trakto defektai, MVN – mitralinio vožtuvo nesandarumas, PAL – pertrauktas aortos lankas, PPD – prieširdžių pertvaros defektas, PPA – periferinė plaučių arterijos stenozė, PAS – plaučių arterijos stenozė, PAVS – plaučių arterijos vožtuvo stenozė, SKT – stambųjų kraujagyslių transpozicija, SVAS – subvožtuvinė aortos stenozė, SPD – skilvelių pertvaros defektas, TA – *truncus arteriosus*, TF – tetrada Fallot, VAPVD – visiškai anomalus plaučių venų drenažas

Atsiradusios ir plačiai taikomos lyginamosios genomo hibridizacijos technologijos teikia galimybę nustatyti naujus mikrodelecijų / mikroduplikacijų sindromus. Lyginamosios hibridizacijos metodų pritaikymas ĮŠY tyrimuose plačiau aptariamas 2.8. skyriuje.

**Taškinės genų mutacijos.** Apie 3–5 proc. ĮŠY gali būti priskiriama mendeliniais sindromams, kai taškinė geno mutacija lemia patologiją, paveldimą pagal mendelinį paveldėjimo modelį [van der Bom *et al.*, 2011]. Šeiminės ĮŠY mutacijos paveldimos autosominiu dominantiniu (AD), autosominiu recesyviniu (AR) ar su X chromosoma susijusiu būdu ir pasižymi dideliu penetrantiškumu ir įvairia klinicine raiška. Kita vertus, skirtingų genų mutacijos gali nulemti identišką fenotipinį pasireiškimą, ir tai savo ruožtu parodo labai glaudų širdies vystymesi dalyvaujančių molekulių funkcijų ryšį.

Taškinės mutacijos padidina arba sumažina dozę genų, dalyvaujančių svarbiuose organogenezės mechanizmuose. Nustatyta, kad mutacijos fibrilino1 gene *FBN1* lemia *Marfan* sindromą, paveldimą AD būdu, kuris pasireiškia progresuojančiu aortos šaknies išsiplėtimu, skeleto ir akių patologija [Dietz *et al.*, 1991]. *Alagille* sindromą lemia Notch signalinio kelio transmembraninio receptoriaus *NOTCH2* ir ligando *JAG1* (90 proc. atvejų) genų dominantinės mutacijos. *Alagille* sindromui būdingi klinikiniai požymiai yra savita veido išraiška, plaučių arterijos stenozė, TF ir kitos širdies ydos, akių patologija, cholestazė ir skeleto anomalijos [McDaniell *et al.*, 2006]. *Holt–Oram* sindromas pasižymi viršutinių galūnių anomalijomis, SPD, PPD, laidumo sistemos sutrikimais. Sindromą lemia *TBX5* geno dominantinės funkcijos praradimo mutacijos. *TBX5* geno raiška vyksta viršutinių galūnių srityje ir širdyje [Showell *et al.*, 2004]. *Noonan* sindromo klinikiniai požymiai yra tipiški veido bruožai, pažintinių funkcijų sutrikimas, širdies ydos, iš kurių dažniausia plaučių arterijos vožtuvo stenozė, hipertrofinė kardiomiopatija, krešėjimo sutrikimai. Sindromą lemia vieno iš 12-os genų: *BRAF*, *CBL*, *HRAS*, *KRAS*, *MAP2K1/MEK1*, *MAP2K2/MEK2*, *NRAS*, *RAF1*, *RIT1*, *PTPN11*, *SOS1* ir *SHOC2* dominantinė mutacija [Yaoita *et al.*, 2016]. *PTPN11* geno, kuris dalyvauja Ras signaliniame kelyje, mutacija lemia 50 proc. sindromo atvejų [Tartaglia *et al.*, 2002]. *LEOPARD* ir *Costello* sindromai, kurių fenotipinė išraiška panaši į *Noonan* sindromo, nulemti Ras signaliniame kelyje dalyvaujančių receptorių ir ligandų mutacijų [Sarkozy *et al.*, 2008; Gripp and Lin, 2012]. Širdies anomalijos siejamos taip pat su *CHARGE* (*CHD7* ir *SEMA3E* genai), *Mowat–Wilson* (*ZEB2* genas), *Kabuki* (*KMT2D* ir *KDM6A* genai), *Sotos* (*NSD1* genas) sindromais, kuriuos lemia dominantinės genų mutacijos [Lalani *et al.*, 2004; Tatton–Brown *et al.*, 2005; Van Laarhoven *et al.*, 2015; Kohmoto *et al.*, 2016; Moore *et al.*, 2016].

#### 2.7.2.2. Nesindrominės ĮŠY

Nors ĮŠY pasireiškia dažniausiai kaip izoliuoti defektai (nesindrominės ĮŠY), šios grupės etiologija vis dar lieka mažiausiai ištirta. Izoliuotoms ĮŠY dažniausiai būdingas AD paveldėjimas su variabilia fenotipine raiška ir mažesniu penetrantiškumu. Rečiau tokios ĮŠY paveldimos AR ar su X chromosoma siejamu paveldėjimu. Tačiau daugeliu atvejų lieka neaiškus mutacijų patogeniškumas ir jų vaidmuo ligos fenotipui ir segregacijai. *GATA4* ir *NKX2-5* buvo pirmieji genai, kuriuose nustatytos AD būdu paveldimos mutacijos asmenims su izoliuotais širdies defektais [Schott *et al.*, 1998; Garg *et al.*, 2003]. Pozicinio klonavimo būdu nustatyti *ZIC3*, *GATA4*, *NKX2-5*, *NKX2-6*, *MYH6*, *ACTC1* ir *NOTCH1* genai. Panaudojus kitus genų kandidatų

nustatymo metodus, buvo identifikuoti *TBX1*, *TBX20*, *CFC1*, *CITED2*, *CRELD1*, *FOG2*, *LEFTY2*, *NODAL*, *GDF1*, *FOXH1*, *TDGF*, *MYOCD*, *TLL1*, *MED13L*, *ANKRD1* genai. Šiuo metu žinoma daugiau kaip 50 genų, kurių mutacijos lemia izoliuotas ĮŠY (2.3 lentelė). Remiantis koduojamomis funkcijomis, šie genai gali būti skirstomi į tris pagrindines grupes: transkripcijos veiksniai, receptoriai / ligandai ir struktūriniai baltymai. Dauguma nustatytų mutacijų yra AD būdu paveldimi *missens* variantai su įvairaus laipsnio penetrancija. Genų kandidatų paieškos klasikinių strategijų (pvz., sankibos analizės) apribojimas yra mažas skaičius didelių šeimų, kuriose šeimos nariai keliose kartose turi ĮŠY. Todėl buvo ieškoma alternatyvių genetinių ĮŠY priešasčių paieškos metodų.

Vienas iš tokių metodų yra genų kandidatų variantų asociacijų su ĮŠY fenotipais nustatymas. Šių tyrimų metu buvo nustatyta genų dažnų variantų asociacija su didesne rizika kai kuriems ĮŠY tipams. *PTPN11* gene, lemiančiame *Noonan* sindromą, asocijuotą su ĮŠY, nustatytas variantas (rs11066320), kuris 10 proc. didina TF riziką [Goodship *et al.*, 2012]. Vėliau buvo atlikti gerokai efektyvesni viso genomo asociacijos su tiriamu požymiu tyrimai (angl. GWAS) ir nustatyta daugybė statistiškai reikšmingų asociacijų tarp specifinių genomo sričių ir daugiaveiksnių žmogaus ligų. Tačiau ĮŠY tyrimuose šis metodas nebuvo toks sėkmingas dėl ĮŠY fenotipų heterogeniškumo.

2.3 lentelė. Genai, siejami su nesindrominėmis IŠY

<b>Genas*</b>	<b>Genominė sritis</b>	<b>IŠY fenotipai</b>
<b>Transkripcijos veiksniai ir kofaktoriai</b>		
<i>ANKRD1</i>	10q23.31	VAPVD
<i>CDK13</i>	7p14.1	PPD, SPD
<i>CITED2</i>	6q23.3	SPD, PPD
<i>FOG2/ZFPM2</i>	8q23	TF, DIDS
<i>FOXF1</i>	16q24.1	Plautinių venų anomalijos
<i>FOXH1</i>	8q24.3	TF, SKT
<i>GATA4</i>	8p23.1	PPD, PAS, SPD, TF, AVK, DAPVĮ
<i>GATA6</i>	18q11.1q11.2	PPD, TF, PAS, APD, AAL, SPD
<i>HAND1</i>	5q33	KŠHS
<i>HAND2</i>	4q33	TF
<i>IRX4</i>	5p15.3	SPD
<i>MED13L</i>	12q24.21	SKT
<i>MYOCD</i>	17p12	AAL
<i>NKX2-5</i>	5q34	SPD, PPD, TF, KŠHS, AoKo, SKT, DIDS, PAL, heterotaksija, EB
<i>NKX2-6</i>	8p21.2	AAL
<i>PRKD1</i>	14q12	AVK, plaučių arterijos vožtuvo anomalijos
<i>SMAD2</i>	18q21.1	Dekstrokardija, AVK, PAS
<i>TBX1</i>	22q11.21	TF, SPD, PAL
<i>TBX5</i>	12q24.1	PPD, SPD, AVK
<i>TBX20</i>	7p14.3	PPD, SPD, AoKo, AAL, AVK
<i>TFAP2B</i>	6p12	AAL
<i>ZIC3</i>	Xq26.2	SKT, PAS, DIDS, VAPVD, PPD, KŠHS, SPD, dekstrokardija, heterotaksija
<b>Receptoriai, ligandai ir signalinės molekulės</b>		
<i>ACVR1/ALK2</i>	2q23q24	AVK, PPD, SKT, DIDS
<i>ACVR2B</i>	3p22	PAS, DIDS, SKT, dekstrokardija, heterotaksija
<i>ALDH1A2</i>	15q21.3	TF
<i>CCDC11</i>	18q21.1	Heterotaksija
<i>CFC1</i>	2q21.1	TF, AVK, PPD, SPD, PAL, SKT, DIDS
<i>CRELD1</i>	3p25.3	PPD, APD
<i>GDF1</i>	19p12	Heterotaksija, TF, SKT, DIDS
<i>GJAI</i>	6q22.31	PPD, KŠHS, VAPVD
<i>JAG1</i>	20p12.1p11.23	TF, PAS

<b>Genas*</b>	<b>Genominė sritis</b>	<b>IŠY fenotipai</b>
<i>LEFTY2</i>	1q42.1	SKT, APD, PAL, AoKo, heterotaksija
<i>NODAL</i>	10q22.1	SKT, PA, TF, DIDS, dekstrokardija, VAPVD, APD, heterotaksija
<i>NOTCH1</i>	9q34.3	AoS, AoKo, KŠHS, BAV, AoS
<i>PDGFRA</i>	4q12	VAPVD
<i>SMAD6</i>	15q21q22	AoKo, AoS
<i>TAB2</i>	6q25.1	AoS, DAV, aortos dilatacija
<i>TDGF1</i>	3p21.31	TF, SPD
<i>VEGFA</i>	6p21.1	BAV, SPD, PAL, TF, AAL
<b>Struktūriniai baltymai</b>		
<i>ACTC1</i>	15q14	PPD, SPD
<i>ELN</i>	7q11.23	SVAS, PS, AoS
<i>FLNA</i>	Xq28	Širdies vožtuvų displazija
<i>MYH11</i>	16p13.11	AAL, aortos aneurizma
<i>MYH6</i>	14q12	PPD, TA, AoS, SKT
<i>MYH7</i>	14q12	Ebšteino anomalija, PPD
<b>Fermentai</b>		
<i>TLL1</i>	4q32.3	PPD

AoA – aortos atrezija, AAL – atviras arterinis latakas, AoKo – aortos koarktacija, AoS – aortos stenozė, AVK – atrioventrikulinė komunikacija, DAPVĮ – dalinis anomalus plaučių venų įtekėjimas, DAV – dviburis aortos vožtuvas, DIDS – dvigubas ištekėjimas iš dešinio skilvelio, EB – Ebšteino anomalija, HK – hipertrofinė kardiomiopatija, KŠHS – kairiosios širdies hipoplazijos sindromas, KSITD – kairiojo skilvelio išstūmimo trakto defektai, MVN – mitralinio vožtuvo nesandarumas, PAL – pertrauktas aortos lankas, PPD – prieširdžių pertvaros defektas, PPS – periferinė plaučių stenozė, PAS – plaučių arterijos stenozė, PAVS – plaučių arterijos vožtuvo stenozė, SKT – stambiųjų kraujagyslių transpozicija, SVAS – subvožtuvinė aortos stenozė, SPD – skilvelių pertvaros defektas, TA – *truncus arteriosus*, TF – Tetrada Fallot, VAPVD – visiškai anomalus plaučių venų drenažas

\*Žinomų genų, lemiančių monogenines, izoliuotas IŠY, sąrašas buvo sudarytas atrinkus genus iš OMIM duomenų bazės ir mokslinių publikacijų [Wessels and Willems, 2010; Zaidi *et al.*, 2013; Prendiville *et al.*, 2014; Sifrim *et al.*, 2016].

Per pastarąjį dešimtmetį intensyviai besivystančios didelio našumo naujos kartos sekoskaitos technologijos leido analizuoti visą žmogaus genomą. Dabartiniu metu daugiausia dėmesio sutelkta į viso egzomo sekoskaitos tyrimus, t. y. patogeninių mutacijų nustatymą baltymus

koduojančiose genomo srityse. Pritaikius šias novatoriškas platformas didelėse ĮŠY tiriamųjų grupėse, buvo tikrinama hipotezė, ar sporadinės ĮŠY atsiranda dėl *de novo* mutacijų, ar dėl stipraus aplinkos poveikio. Nustatyta, kad *de novo* variantai lemia 10–15 proc. ĮŠY atvejų. Zaidi su kolegomis atliko 362 triadų viso egzomo sekoskaitą sindrominių ir nesindrominių ĮŠY kohortoje ir nustatė, kad galimai patogeninės maždaug 400 genų *de novo* mutacijos paaiškina apie 10 proc. sporadinių ĮŠY. Daugiausia mutacijų rasta genuose, koduojančiuose histonus modifikuojančius baltymus, pvz., *SMAD2* [Zaidi *et al.*, 2013]. Sifrim su kolegomis atliko viso egzomo sekoskaitą 1 891 tiriamojo su sindrominėmis ir nesindrominėmis ĮŠY ir nustatė reikšmingai daugiau *de novo* variantų žinomuose ĮŠY genuose. O nesindrominių ĮŠY grupėje buvo nustatyta reikšmingai daugiau baltymus pertraukiančių variantų žinomuose ĮŠY genuose, paveldėtų iš sveikų tėvų. Nustatyti trys nauji su izoliuotomis ĮŠY siejami genai: *CHD4*, *CDK13* ir *PRKD1* [Sifrim *et al.*, 2016]. Kitame dideliame 2 871 tiriamojo imties tyrime buvo tirti reti paveldimi bei *de novo* variantai ir nustatyta, kad retos paveldimos mutacijos sudaro 1,8 proc., o *de novo* mutacijos – 8 proc., įskaitant 3 proc. izoliuotų ĮŠY grupėje. Tyrimo metu nustatyta 12 naujų genų, reikšmingų ĮŠY etiologijai. Tyrimo autorių teigimu, apie 440 genų yra reikšmingai susiję su ĮŠY [Jin *et al.*, 2017].

Naujos kartos sekoskaitos metodais tiriant genų rinkinius (angl. *gene panels*), buvo rasta naujų patogeninių variantų žinomuose ĮŠY genuose ir nustatyta naujų ĮŠY genų [Bonachea *et al.*, 2014; Blue *et al.*, 2014; Jia *et al.*, 2015].

## 2.8. Kopijų skaičiaus pokyčiai

Modernios žmogaus genomo analizės technologijos atskleidė naujų žinių apie žmogaus genomo įvairovę. Vienas iš genetinių variantų yra DNR sekų kopijų skaičiaus pokyčiai, arba kopijų skaičiaus polimorfizmas (angl. *copy number variation, CNV*). Kopijų skaičiaus pokytis (KSP) – tai >1000 bp dydžio genomo sritis, kuriai būdingas variabilus kopijų skaičius, palyginti su referentiniu žmogaus genomu [Lee *et al.*, 2007]. KSP yra genomo struktūriniai persitvarkymai – delecijos ir duplikacijos. KSP atsiranda dėl genome vykstančios rekombinacijos. Vienas iš pagrindinių KSP atsiradimo mechanizmų yra nealelinė homologinė rekombinacija, tarpininkaujama supančių (flankuojančių) mažo kopijų skaičiaus pasikartojančių sričių, sudarytų iš didelės homologijos genų ar sekų. Kai tokia rekombinacija vyksta mejozėje, jos rezultatas gali būti netolygus genetinių elementų pasiskirstymas į gametas ir KSP atsiradimas palikuonims. Nealelinė homologinė

rekombinacija siejama su didelių KSP atsiradimu. Rekombinacija gali vykti tarp variabilaus skaičiaus tandeminių pasikartojimų (angl. *variable number of tandem repeat, VNTR*), paprastai nulemiančių mažesnių KSP susidarymą [Redon *et al.*, 2006; Conrad *et al.*, 2010]. KSP laikomi potencialiausiai genomo variabilumo elementais, ir KSP *de novo* mutacijų dažnis yra didesnis nei VNP [Lupski, 2007]. Palyginti su VNP, KSP gali varijuoti dydžiu ir genų sudėtimi, ir tai lemia gerokai platesnį genetinių pokyčių spektrą ir didesnę mutacijų dažnį [Lee and Scherer, 2010].

Žmogaus genome retais KSP laikomi tokie genomo struktūriniai persitvarkymai, kurie populiacijoje pasireiškia <1 proc. dažniu, o dažni KSP yra paplitę populiacijoje >1 proc. dažniu. KSP atsiranda santykinai dažnai ir vidutiniškai sudaro apie 12 proc. žmogaus genomo [Redon *et al.*, 2006]. Daugelis KSP yra dažni bendroje populiacijoje ir veikia kaip neutralūs variantai arba turi mažą fenotipinį pasireiškimą [Lee and Scherer, 2010; Costain *et al.*, 2016]. Kur kas mažesnė dalis yra reti, dažniausiai dideli ir *de novo* KSP, kurie vertinami kaip patogeniniai variantai ir siejami su ligomis [Southard *et al.*, 2012]. KSP gali apimti dozei jautrų geną, pertraukti geno ar jo reguliacinių elementų seką. Toks genomo pokytis turi įtakos genų raiškai, fenotipo variacijai ir adaptacijai, didina daugiaveiksnių ligų riziką ar gali lemti ligas. Be to, KSP gali netiesiogiai daryti įtaką geno raiškai per pozicijos efektą, didinti polinkį į žalingus pokyčius ar būti substratu chromosominiams pokyčiams evoliucijoje [Feuk *et al.*, 2006]. Daugeliui retų patogeninių KSP būdinga variabili raiška ir / ar nevisiška penetrancija.

Atsiradusios ir įsigalėjusios plataus masto lyginamosios genomo hibridizacijos technologijos lėmė naujos genominės eros atsiradimą, kai buvo nustatyta tūkstančiai naujų genominių veiksmų ir apibūdinta daugybė iki tol neaiškių klinikinių būklių. Buvo įrodyta, kad patogeniniai KSP svarbūs intelektinės negalios, autizmo spektro sutrikimų, šizofrenijos, raidos atsilikimo ir ĮŠY etiologijai [Walsh *et al.*, 2008; Rosenfeld *et al.*, 2010; Cooper *et al.*, 2011; Warburton *et al.*, 2014].

Lietuvoje moksliniai KSP tyrimai buvo pradėti 2011 m. vykdant nacionalinį LITGEN ir tarptautinį CHERISH projektus [Čiuladaitė *et al.*, 2012; Urnikytė *et al.*, 2016].

### 2.8.1. Patogeninių KSP nustatymas ĮŠY grupėje

Lyginamosios genomo hibridizacijos (LGH) metodų atradimas ir platus pritaikymas nustatant submikroskopines aberacijas labai padidino nustatytų širdies anomalijų atvejų skaičių. Buvo nustatyti unikalūs KSP, susiję su ĮŠY. Remiantis ACMG pateiktomis potencialiai patogeninių KSP klinikinio



interpretavimo rekomendacijomis [Kearney *et al.*, 2011], patogeniniai KSP širdies ydų etiologijoje yra KSP, kurie: 1) apima žinomus dozei jautrius ĮŠY genus, lemiančius panašų fenotipą; 2) sutampa su žinomą ligą lemiančia genomine sritimi; 3) pasireiškia *de novo* arba segreguoja su šeimos fenotipu; 4) lokalizuojasi genų gausioje genominiėje srityje; 5) dideli kb apimtimi (priklauso nuo tyrimo atlikimo ypatumų); 6) reti (pasireiškia <1 proc. dažniu sveikų asmenų kontrolinėje grupėje). Patogeniniai KSP nustatomi asmenims, turintiems sindromines ĮŠY, ar ĮŠY su kitomis raidos anomalijomis, ar izoliuotas ĮŠY.

#### 2.8.1.1. Sindrominės ĮŠY, nulemtos KSP

KSP tyrimai, naudojant LGH metodus, ĮŠY tyrimuose pirmiausia buvo pradėti taikyti tiriant sindromines ĮŠY. Nustatyta, kad 17–18 proc. sindrominių ĮŠY atvejų lemia KSP [Thienpont *et al.*, 2007; Breckpot *et al.*, 2010]. Thienpont su kolegomis pirmieji atliko genomo analizę LGH metodu tiriamųjų, kurie turi ĮŠY, kitas įgimtas raidos anomalijas ir normalų kariotipą, ir nustatė, kad 17 proc. KSP buvo lokalizuoti genomine srityse, apimančiose širdies vystymuisi svarbius genus, tokius kaip *NKX2-5* ir *NOTCH1* [Thienpont *et al.*, 2007]. Breckpot su kolegomis analizavo 150 pacientų, turinčių neaiškios priežasties sindrominių ĮŠY, ir nustatė 18 proc. retų kliniškai reikšmingų KSP [Breckpot *et al.*, 2010]. Nors daugelis ĮŠY grupėje nustatomų KSP yra unikalūs, kai kurie jų yra pasikartojantys KSP (angl. *recurrent CNV*). Pavyzdžiui, 22q11.2 delecija yra dažniausiai pasikartojanti *de novo* KSP, asocijuota su ĮŠY. Širdies anomalijos 22q11.2 delecijos sindromo atveju pasireiškia dideliu penetrantiškumu, siejamos su kūginės skilvelių pertvaros dalies (angl. *conotruncal*) defektais ir nustatomos 10 proc. TF atvejų, 35 proc. *truncus* ir 50 proc. B tipo pertrauktą aortos lanką turintiems pacientams [Rauch *et al.*, 2010]. Pasikartojantys KSP taip pat apima 1q21.1, 3p25.1, 7q11.13, 8p23.1, 11q24–25, 16p13.11 genomines sritis [Greenway *et al.*, 2009; Warburton *et al.*, 2014].

Patobulėjus didelės skiriamosios gebos lyginamosios genomo hibridizacijos technologijoms, buvo atrasta daug naujų mikrodelecijų / mikroduplicacijų sindromų, ir dabar žinoma apie 50 tokių sindromų, asocijuotų su ĮŠY (2.4 lentelė).

2.4 lentelė. Mikrodelecijų ir mikroduplicacijų sindromai, nulemti KSP

OMIM	Chromosominė liga / sindromas	Chromosomos sritis	Genai kandidatai	Dažnis tarp IŠY turinčių asmenų (%)	IŠY tipai
<b>Mikrodelecijų sindromai</b>					
607872	1p36 delecijos sindromas	1p36	<i>DVLI</i>	43–71	SPD, PPD, AAL, aortopatija
612474	1q21.1 delecijos sindromas	1q21.1	<i>GJA5</i>	29	SPD, TA, SKT, DAV, AoKo, AAL
612530	1q41q42 delecija	1q41q42	<i>DISP1</i> *	n/d	TF, AAL
612513	2p16.1p15 delecija	2p16.1p15	n/d	n/d	DAV, MVN
–	2q31.1 mikrodelecijos sindromas	2q31.1	<i>SP3</i>	70	TF
600430	2q37 delecijos sindromas	2q37	<i>HDAC4</i>	20	PPD, SPD, AAL, AoKo
609425	3q29 delecija	3q29	<i>PAK2</i>	n/d	AAL, PPD, SPD, TOF
117550	<i>Sotos</i> sindromas	5q35.3	<i>NSD1</i>	21	SPD, PPD
612582	6pter–p24 delecija	6pter–p24	n/d	n/d	SPD, TF, AAL
612863	6q24q25 delecija	6q24q25	n/d	n/d	PPD, SPD, PAS
154230	9p24.3 delecija	9p24.3	n/d	n/d	PPD, SPD, AoKo, AAL
610253	<i>Kleefstra</i> sindromas	9q34.3	<i>EHMT1</i>	40	PPD, SPD, PAS, TF, DAV, AoKo, AAL
–	8p23.1 delecijos sindromas	8p23.1	<i>GATA4</i>	75–94	SPD, PPD, TF, AVK, PS, TF
600383	<i>Mesomelia-synostoses</i>	8q13	n/d	n/d	SPD, PPD, AoKo, AAL
61242	10q23 delecija	10q23	n/d	n/d	SPD, PPD
609625	10q26 delecija	10q26	n/d	n/d	PPD, AAL
613457	14q11q22 delecija	14q11q22	n/d	n/d	SPD, AAL
612001	15q13.3 sindromas	15q13.3	n/d	15	TF

OMIM	Chromosominė liga / sindromas	Chromosomos sritis	Genai kandidatai	Dažnis tarp IŠY turinčių asmenų (%)	IŠY tipai
613406	15q24 delecija	15q24	<i>STRA6</i>	n/d	Aortopatija, SPD, TF
612626	15q26qter delecija	15q26qter	<i>MCTP2*</i> ; <i>NR2F2*</i>	66	SPD, PPD, AoKo, KŠHS, AoS
611913	16p11.2 delecija	16p11.2	<i>KCTD13*</i> , <i>TBX6*</i> , <i>ANKRD26PI*</i>	n/d	DAV, AoS, TF
136570	16p12.1 delecija	16p12.1	n/d	n/d	SPD, PAS, DIDS, DAV, KŠHS, VAPVD
613604	16p12.2p11.2 mikrodelecijos sindromas	16p12.2p11.2	n/d	60	PAA, TF, aortos vožtuvo anomalijos
610543	16p13.3 delecija	16p13.3	n/d	n/d	HKŠS
14050	KBG sindromas (16q24.3 delecija)	16q24.3	<i>ANKRD11*</i>	n/d	PPD, aortos dilatacija, PAS
247200	<i>Miller-Dieker</i> sindromas	17p13.3	<i>PAFAH1B1*</i>	22	PPD, AAL
182290	<i>Smith-Magenis</i> sindromas	17p11.2	<b><i>RAI1</i></b> ; <i>MAPK7</i>	40–45	SPD, PPD, PAS, PAA, TF, AoS, VAPVD
610443	<i>Koolen-De Vries</i> sindromas	17q21.31	<b><i>KANSL1</i></b>	27–36	SPD, PPD, PAS, DAV, aortopatija
613355	17q23 mikrodelecijos sindromas	17q23.1q23.2	<b><i>TBX2</i></b>	86	PPD, DAV, AAL
146390	18p delecija	18p	n/d	n/d	SPD, AoS, KŠHS, AAL
601808	18q delecija	18q	n/d	n/d	SPD, PPD, PAS, PAA, AoS, AAL, aortopatija
611867	Distalinė 22q11.2 delecija	22q11.2	n/d	n/d	SPD, PAS, TA, DAV, AAL, hipoplastinis aortos lankas

OMIM	Chromosominė liga / sindromas	Chromosomos sritis	Genai kandidatai	Dažnis tarp ĮŠY turinčių asmenų (%)	ĮŠY tipai
<b>Mikroduplicacijų sindromai</b>					
612475	1q21.1 duplikacija	1q21.1	<i>PRKAB2, CHD1L, BCL9, GJA5</i>	20	TOF
613458	16p13.11 duplikacijos sindromas	16p13.11	<i>MYH11</i>	20	Aortos disekacija
613458	16p13.3 mikroduplicacija	16p13.3	<i>CREBBP</i>	40	PPD, TF
610883	<i>Potocki-Lupski</i> sindromas	17p11.2	<i>MAPK7</i>	50	SPD, PPD, DAV, KŠHS, AoS, aortopatija
608363	22q11.2 duplikacijos sindromas	22q11.2	<i>TBX1</i>	15	SKT, DIDS, AoKo

Genai, lemiantys pelių ĮŠY (<http://www.informatics.jax.org>), paryškinti. Genai, kurių taškinės mutacijos lemia ĮŠY, yra pabraukti. \* – genai, kurių raiška vyksta vaisiaus širdyje (<http://www.bgee.org>). n/d – nėra duomenų.

AAL – atviras arterinis latakas, AoKo – aortos koarktacija, AoS – aortos stenozė, AVK – atrioventrikulinė komunikacija, DAPVĮ – dalinis anomalus plaučių venų įtekėjimas, DAV – dviburis aortos vožtuvas, DIDS – dvigubas ištekėjimas iš dešiniojo skilvelio, KŠHS – kairiosios širdies hipoplazijos sindromas, MVN – mitralinio vožtuvo nesandarumas, PPD – prieširdžių pertvaros defektas, PAA – plaučių arterijos atrezija, PAS – plaučių arterijos stenozė, SKT – stambųjų kraujagyslių transpozicija, SPD – skilvelių pertvaros defektas, TA – *truncus arteriosus*, TF – tetraada Fallot, VAPVD – visiškai anomalus plaučių venų drenažas

### 2.8.1.2. ĮŠY su kitomis įgimtomis raidos anomalijomis, nulemtos KSP

KSP labai svarbūs daugiaveiksnių įgimtų raidos defektų patogenezėje [Serra–Juhé *et al.*, 2012; Southard *et al.*, 2012]. Didžioji dalis KSP tyrimų, analizuojančių KSP reikšmę ĮŠY atsirasti, atlikta tiriamiesiems, turintiems ĮŠY ir kitas įgimtas raidos anomalijas. Maždaug 22 proc. pacientų ĮŠY būna su kitomis įgimtomis raidos anomalijomis, dismorfiniais požymiais, raidos ir / ar augimo atsilikimu. Daugeliui tokių pacientų yra neurologinė simptomatika – intelektinė negalia, autizmas, epilepsija, mikrocefalija ir kt. [Meberg *et al.*, 2007; Øyen *et al.*, 2010]. Tyrimų, kuriuose analizuota KSP reikšmė ĮŠY ir kitas įgimtas raidos anomalijas turinčių tiriamųjų grupėje, rezultatai parodė, kad KSP lemia 3–28 proc. tokių atvejų [Richards *et al.*, 2008; Lalani *et al.*, 2013; Syrmou *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2017]. Palyginti verta paminėti, kad panašus KSP dažnis nustatytas tyrimuose, kuriuose tirti tiriamieji, turintys autizmo spektro sutrikimų (18,2 proc. patogeninių KSP) ir / ar kurių atsilikęs vystymasis ar turintys intelektinę negalią (15–20 proc. patogeninių KSP) [Chung *et al.*, 2014; Preikšaitienė *et al.*, 2016; Uddin *et al.*, 2016].

Kitame tyrime 20,7 proc. potencialiai patogeninių KSP buvo nustatyta pacientams, turintiems ĮŠY ir kitas įgimtas raidos anomalijas. Rasti KSP apėmė *NRPI*, *NTRK3*, *MESPI*, *ADAM19* ir *HAND1* genus, dalyvaujančius širdies vystymesi [Goldmuntz *et al.*, 2011]. An su kolegomis tyrė tiriamųjų, turinčių izoliuotą SPD ir SPD su kitomis įgimtomis raidos anomalijomis, imtį ir nustatė 16,9 proc. patogeninių KSP, apimančių 18 SPD genų kandidatų [An *et al.*, 2016].

### 2.8.1.3. Izoliuotos ĮŠY, nulemtos KSP

Dažniausiai ĮŠY pasireiškia izoliuota forma, todėl izoliuotų ĮŠY genetinių variantų tyrimai kelia ypatingą susidomėjimą. Izoliuotų ĮŠY tyrimus apsunkina tai, kad ĮŠY turintiems naujagimiams ar mažamečiams vaikams kitos raidos anomalijos gali pasireikšti vėlesniame amžiuje ir nėra nustatomos tyrimo atlikimo metu.

Erdogan su kolegomis atliko LGH analizę asmenims, kuriems yra įvairios izoliuotos ĮŠY, ir nustatė 3 proc. *de novo* patogeninių KSP variantų [Erdogan *et al.*, 2008]. Šio tyrimo KSP nustatymo dažnis atitiko kitų atliktų tyrimų rezultatus [Zhao *et al.*, 2013]. Soemedi su kolegomis nustatė, kad 4 proc. retų, genus apimančių delecijų siejamos su sporadinių ĮŠY rizika. Šiame tyrime buvo atrastas naujas ĮŠY genas kandidatas *PLXNA2* [Soemedi *et al.*, 2012]. Geng su kolegomis izoliuotų ĮŠY grupėje nustatė 4,3 proc. patogeninių KSP, apimančių naujus ĮŠY genus – *SORBS2*, *PDLIM3*,

*SLC25A4* [Geng *et al.*, 2014]. Aprašyta keletas tyrimų, kuriuose tiriamųjų imtį sudarė asmenys, turintys ĮŠY arba ĮŠY ir kitus klinikinius požymius. Šiame tyrime reti, patogeniniai KSP variantai sudarė 5–7 proc. [Tomita-Mitchell *et al.*, 2012; Connor *et al.*, 2014; Bachman *et al.*, 2015]. Patogeninių KSP nustatymo dažnių skirtumai atsiranda dėl skirtingo atliekamų tyrimų dizaino – ĮŠY nustatymo strategijų, pacientų atrankos kriterijų, skirtingos skiriamosios gebos lustų ir KSP nustatymo algoritmų panaudojimo. Didesnis KSP nustatymo dažnis susijęs su didesnės skiriamosios gebos platformų, kurios leidžia nustatyti mažesnius patogeninius KSP variantus, panaudojimu.

Dauguma izoliuotų ĮŠY tyrimų atliekama specifinių širdies ydų patogeninių KSP variantų paieškai. Greenway su kolegomis tyrė izoliuotą TF ir išklėlė hipotezę, kad *de novo* mutacijos, keičiančios širdies vystymesi dalyvaujančių genų dozę, gali lemti izoliuotą TF. Nustatyta, kad 10 proc. izoliuotų, sporadinių TF lemia *de novo* KSP variantai, palyginti su 4 proc. kontrolinėje grupėje [Greenway *et al.*, 2009]. Kitas tyrimas parodė, kad *de novo* patogeniniai KSP variantai lemia 9–11 proc. izoliuotų TF [Derwinska *et al.*, 2012; Silversides *et al.*, 2012]. Šis tyrimas patvirtina hipotezę, kad patogeniniai KSP labai svarbūs TF patogenezėje.

Carey su kolegomis tyrė tiriamųjų, turinčių izoliuotų bendro skilvelio defektų, iš jų ir KŠHS, imtį ir nustatė 14 proc. galimai patogeninių KSP, palyginti su 4,4 proc. kontrolinėje grupėje [Carey *et al.*, 2013]. Warburton su kolegomis tyrė KSP tiriamųjų, turinčių kūginės skilvelių pertvaros dalies defektų ir KŠHS, ir nustatė 12,7 proc. *de novo* KSP, iš kurių 5,6 proc. buvo reikšmingai susiję su ĮŠY, palyginti su 2 proc. kontrolinėje grupėje [Warburton *et al.*, 2014]. Hitz su kolegomis, tirdamas kairiosios širdies pusės ydas, nustatė, kad 10 proc. unikalų KSP apima 25 genus kandidatus, tokius kaip *SMCIA*, *MFAP4*, *CTHRC1* [Hitz *et al.*, 2012]. Kitame izoliuotų kairiosios širdies pusės ydų tyrime kliniškai reikšmingi *de novo* KSP buvo nustatyti 1,8 proc. tiriamųjų [Hanchard *et al.*, 2017]. Šie radiniai sutampa su 2 proc. dažniu vieno nukleotido mutacijų, nustatytų viso egzomo sekoskaitos metodu izoliuotų ĮŠY grupėje [Homsy *et al.*, 2015]. KSP patogeninis vaidmuo nustatytas ir tiriamųjų, kuriems yra heterotaksijos sindromas, – reti, apimantys genus KSP rasti 15 proc. tiriamųjų, palyginti su 7,4 proc. kontrolinėje populiacijoje [Fakhro *et al.*, 2011]. Liu su kolegomis tiriamųjų, kuriems yra heterotaksijos sindromas, grupėje nustatė 23,7 proc. retų KSP, kurie apėmė naujus genus kandidatus *DNAH10* ir *RNF115* [Liu *et al.*, 2018].

Integruotuose VNP-LGH ir egzomo sekoskaitos tyrimuose buvo nustatytas didesnis *de novo* KSP dažnis lyginant ĮŠY ir sveikų asmenų triadų duomenis: reti *de novo* KSP apėmė genus *DUSP1*, *JUN*, *JUP*, *MED15*,

*MED9*, *PTPRE*, *SREBF1*, *TOP2A* ir *ZEB2* genus, sąveikaujančius su ĮŠY baltymais NKX2-5 ir GATA4 [Glessner *et al.*, 2014].

Atliekant ĮŠY triadų tyrimus nustatyta, kad dalis atvejų yra šeiminiai, kai pacientams nustatyti KSP buvo paveldėti iš sveikų tėvų. Šie KSP padidina polinkį į ĮŠY, tačiau fenotipui pasireikšti reikalingi ir kiti modifikuojantys genetiniai ar aplinkos veiksniai. Tai leidžia manyti, kad reti KSP gali būti svarbūs genetiniai veiksniai ĮŠY patogenezėje [Glessner *et al.*, 2014].

Naujų ir intriguojančių duomenų pateikė Kim su kolegomis, jie analizavo ne tik didelių KSP (>300 kb) dažnio izoliuotų ĮŠY grupėje, bet ir KSP dažnio genome ir išgyvenamumo po širdies operacijos ar transplantacijos priklausomybę. Buvo nustatyta, kad KSP sudaro 12,2 proc., palyginti su 5 proc. kontrolinėje grupėje; o padidėjęs KSP dažnis 2,55 karto didina mirties riziką po širdies operacijų ar transplantacijų [Kim *et al.*, 2016]. Ta pati mokslininkų grupė anksčiau nustatė *VEGFA* ir *SOD2* genetinių variantų, kurie dalyvauja kraujagyslių atsako ir oksidacinio streso procesuose, reikšmę išgyvenamumui po širdies operacijos [Kim *et al.*, 2014].

### 3. TYRIMO METODAI

Mokslinis darbas vykdytas 2014–2018 m. VU Medicinos fakulteto Biomedicinos mokslų instituto Žmogaus ir medicininės genetikos katedroje (VU MF BMI ŽMGK). Mokslinis tyrimas atliktas laikantis asmens duomenų apsaugos ir biomedicininų tyrimų etikos reikalavimų. Moksliniam tyrimui atlikti buvo gautas Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto leidimas Nr. 158200–15–782–296 (1 priedas) ir patvirtintos asmens informavimo ir informuoto asmens sutikimo formos. Darbo autorės atliktų darbų indėlis pateikiamas 4 priede.

#### 3.1. Tiriamųjų asmenų atranka

Biomediciniam tyrimui buvo kviečiami asmenys, konsultuoti VŠĮ VUL SK Medicininės genetikos centre ir VŠĮ VUL SK Širdies ir krūtinės chirurgijos centre 2015–2018 metais. Siekiant surinkti tiriamųjų grupę, buvo sudaryti tiriamųjų asmenų atrankos kriterijai:

- įgimta širdies yda, diagnozuota bet kuriame amžiuje;
- kompleksinė įgimta širdies yda, diagnozuota bet kuriame amžiuje;
- įgimta širdies yda su kitomis įgimtomis raidos anomalijomis ir / ar dismorfinais požymiais, diagnozuota bet kuriame amžiuje;
- įgimta širdies yda, esanti vienu iš kliniškai atpažįstamo sindromo, kurio genetinė priežastis nepatvirtinta, požymiu.

Į biomedicininį tyrimą buvo įtraukti atrankos kriterijus atitinkantys asmenys, kurie arba kurių tėvai / globėjai (jei asmuo nepilnametis) sutiko dalyvauti tyrime. Tiriamųjų arba jų tėvų / globėjų (jei tiriamasis nepilnametis) sutikimas buvo išreikštas pasirašant „Informuoto asmens sutikimo formą“. Į biomedicininį tyrimą nebuvo įtraukti asmenys, kuriems: 1) nustatyta chromosomų aneuploidija, t. y. *Down*, *Edwards*, *Patau*, *Turner* ar *Klinefelter* sindromas; 2) diagnozuota nesudėtinga ĮŠY – atvira ovalioji anga; 3) diagnozuota aritmija arba kardiomiopatija.

Į tiriamųjų asmenų grupę įtraukti 132 asmenys, iš jų 57 vyriškos ir 75 moteriškos lyties. Tiriamųjų, turinčių izoliuotą ĮŠY, pogrupį sudarė 17 asmenų; tiriamųjų, turinčių ĮŠY su kitomis įgimtomis raidos anomalijomis ir / ar dismorfinais požymiais, pogrupį – 90 asmenų; tiriamųjų, kuriems nustatyta ĮŠY buvo vienu iš kliniškai atpažįstamo sindromo požymių, pogrupį sudarė 25 asmenys. Dviejų tiriamųjų genealogijose ĮŠY buvo nustatytos probando pirmos eilės giminaičiams.

Nustatytų kopijų skaičiaus pokyčių kilmei įvertinti ir patvirtinti į tyrimą buvo įtraukti tėvai tiriamųjų, kuriems buvo nustatyti galimai



patogeniniai ar neaiškios kilmės KSP. Pavieniais atvejais atlikti tyrimai sibsui, turinčiam ĮŠY.

Mokslinio darbo kontrolinę grupę sudarė LITGEN biomedicinio tyrimo etninė sveikų lietuvių populiacijos asmenų grupė, sudaryta iš atsitiktinai parinktų asmenų iš Lietuvos šešių etnolingvistinių regionų (Rytų, Pietų, Vakarų Aukštaitija ir Šiaurės, Pietų, Vakarų Žemaitija). Šių asmenų mažiausiai trys kartos gyveno tame pačiame regione. LITGEN populiacinis tyrimas atliktas 2011–2013 m. VU Medicinos fakulteto Žmogaus ir medicininės genetikos katedroje (VU MF ŽMGK) (Vilniaus regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto leidimas Nr. 158200–05–329–79). KSP nustatymo dažniui palyginti naudota 355 sveikų asmenų kontrolinė grupė. Ją sudarė 170 vyriškos lyties asmenų ir 185 moteriškos lyties asmenys. Kontrolinės grupės asmenims nebuvo diagnozuotos ĮŠY ar kitos įgimtos raidos anomalijos.

### 3.2. Tiriamųjų asmenų klinikinių duomenų rinkimas

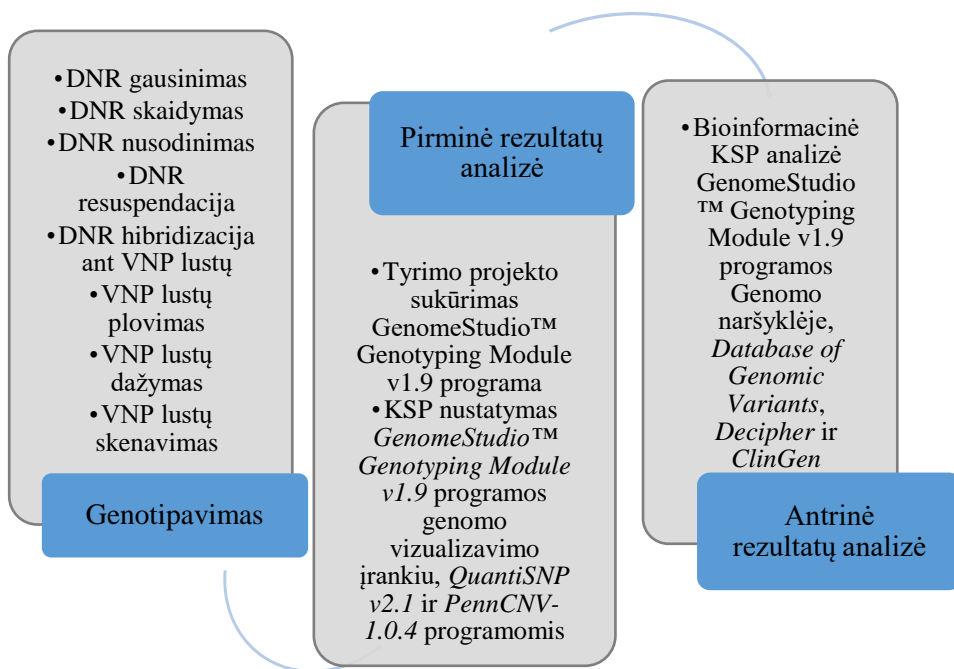
Biomediciniame tyrime dalyvaujančių tiriamųjų asmenų anamnezės ir klinikiniai duomenys buvo rinkti iš medicininių pacientų dokumentų, naudojant VŠĮ VUL Santaros klinikų elektroninę ligos istoriją (Eli). Buvo renkami šeimos genealogijos, anamnezės, fenotipo, sindromologinės analizės, echokardioskopijos, magnetinio rezonanso ar chirurginių operacijų protokolų duomenys ir įvertintos gydytojų kardiologų ir gydytojų genetikų konsultacijų išvados. Tiriamųjų asmenų duomenys buvo koduojami, suteikiant unikalų identifikacinį numerį, ir renkami Excel rinkmenoje.

### 3.3. Tiriamųjų asmenų grupės genetiniai tyrimai

#### 3.3.1. Vieno nukleotido polimorfizmo lyginamosios genomo hibridizacijos tyrimas

Kopijų skaičiaus pokyčiams – delecijoms ir duplikacijoms – nustatyti ir jų patogeniškumui ĮŠY etiopatogenezeje įvertinti VNP-LGH tyrimas atliktas 132 tiriamiesiems, turintiems ĮŠY. Tiriamųjų genomine DNR buvo išskirta iš 3–10 ml veninio kraujo, naudojant fenolio ir chloroformo išskyrimo metodą pagal VŠĮ VUL SK generalinio direktoriaus įsakymu Nr. 461 patvirtintą MGC diagnostikos protokolą „DNR išskyrimas fenolio chloroformo metodu“. VNP-LGH tyrimui buvo ruošiami 50 ng/μl koncentracijos DNR mėginiai. DNR koncentracija ir švarumas buvo nustatomas spektrofotometru NanoDrop®. DNR koncentracijos ir švarumo nustatymo protokolas parengtas pagal NanoDrop® prietaiso gamintojo

pateikiamą vartotojo vadovą NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer User Manual. DNR išskyrimą, koncentracijos ir švarumo nustatymą atliko VšĮ VUL SK MGC Molekulinės genetikos ir citogenetikos laboratorijos darbuotojai.



3.1 paveikslas. VNP-LGH tyrimo schema (adaptuota iš VšĮ VUL SK MGC diagnostikos protokolo „VNP lyginamosios geno hibridizacijos tyrimas“)

VNP-LGH tyrimas atliktas pagal patvirtintą VšĮ VUL SK MGC diagnostikos protokolą „VNP lyginamosios geno hibridizacijos tyrimas“. VNP-LGH tyrimo schema vaizduojama 3.1 paveiksle.

### 3.3.1.1. Genotipavimas VNP lustais

VNP genotipavimas atliktas *HumanCytoSNP-12 BeadChip v2.1* lustais (*Illumina, Inc., JAV*) *Infinium® HD* technologija pagal gamintojo pateiktą protokolą (angl. *Infinium® HD Assay Ultra Manual Experienced User Card*). *HumanCytoSNP-12 BeadChip v2.1* lusto charakteristika: 299140 VNP padengimas per genomą, vidutinė 9,7 kb skiriamoji geba. Genotipavimui naudota *Illumina HiScan™SQ* (*Illumina, Inc., JAV*) naujos kartos didelio našumo geno analizės sistema.

### 3.3.1.2. Genotipavimo duomenų analizė

Genotipavimo duomenys buvo analizuojami naudojant *GenomeStudio* v2011.1 programinę įrangą (*Illumina*<sup>®</sup> *GenomeStudio* 2011, *Illumina, Inc.*, JAV) ir *GenomeStudio*<sup>™</sup> *Genotyping Module v1.9* modulį pagal *Illumina* pateiktą *GenomeStudio*<sup>™</sup> Genotipavimo modulio vartotojo vadovą *Genome Studio*<sup>™</sup> *Genotyping Module v1.0 User Guide* ir atsižvelgiant į gamintojo pateikiamas papildomas pataisas. KSP vizualizacijai ir pirminei analizei buvo naudojamas ir *GenomeStudio*<sup>™</sup> *Genotyping Module v1.9* programos Genomo vizualizavimo įrankis (angl. *Illumina Genome Viewer*). Duomenų analizė atliekama vertinant VNP grafikus ir jų parametrų fluorescencijos intensyvumo (R) logaritminio įverčio santykio (angl. *LogR ratio*, LogRR) (reikšmių ribos: – 0,1 ir 0,1) ir B alelio dažnio (angl. *B allele frequency*, BAF) skaitines reikšmes.

KSP nustatymas (angl. *CNVs calling*) iš genotipavimo duomenų ir KSP analizė buvo atliekami naudojant dvi programines įrangas – *QuantiSNP* v2.1 ir *PennCNV-1.0.4* [Colella *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007]. *QuantiSNP* v2.1 algoritmas buvo naudojamas kaip pirminis KSP nustatymo metodas, *PennCNV-1.0.4* algoritmas – kaip patvirtinantis KSP nustatymo metodas. *QuantiSNP* v2.1 ir *PennCNV-1.0.4* programomis KSP yra nustatomi naudojant statistinio objektyvaus Bajeso paslėptų būsenų Markovo modelio (angl. *Objective Bayes-Hidden Markov Model (HMM)*) algoritmą. Analizuojant KSP *QuantiSNP* v2.1 programa naudojamas statistinis įvertis yra Bajeso veiksnio logaritmas (angl. *Log Bayers Factor*) ir vertinama logaritmuota Bajeso veiksnio reikšmė (Max LogBF), parodanti KSP nustatymo patikimumą. Max Log BF rekomenduojama slenkstinė riba yra 30, kai klaidingai teigiamų rezultatų tikimybė yra <1 %. Analizuojant KSP *PennCNV-1.0.4* programa naudojamas statistinis įvertis yra pasiklovimo reikšmė (angl. *Confidence Score*), kurios rekomenduojama slenkstinė riba yra  $\geq 10$ .

Referentinės sekos (angl. *Reference Sequence, RefSeq*) genai, patenkantys į KSP sritį, buvo nustatomi naudojant UCSC (University of California at Santa Cruz) genomine naršyklę ir *NCBI* žmogaus genomo GRCh37/hg19 anotaciją.

### 3.3.1.3. DNR mėginių, genotipuotų VNP ir genotipavimo proceso kokybės kontrolė

DNR mėginių, genotipuotų VNP ir genotipavimo proceso kokybės kontrolė buvo vykdoma remiantis kokybės kontrolės kriterijais ir jų reikšmėmis:

- DNR mėginių kokybės kontrolės pagrindinis kriterijus yra genotipų kokybės klasifikavimo santykis (angl. *Call Rate*), kurio reikšmės 0–100. Buvo vertinami >99 genotipų kokybės klasifikavimo santykio reikšmę turintys DNR mėginiai;
- genotipavimo proceso pagrindinis kokybės kontrolės kriterijus yra santykinis fluorescencijos intensyvumas ir jo reikšmės: didelis intensyvumas – mažas intensyvumas – fonas. Kiti genotipavimo proceso kokybės kontrolės rodikliai ir jų reikšmės pateikiamos 3.1 lentelėje.

3.1 lentelė. Genotipavimo proceso kokybės kontrolės kriterijai ir jų reikšmės

<b>Raudono dažo sistema</b>	<b>Žalio dažo sistema</b>
<b>Nuo mėginio nepriklausomi rodikliai</b>	
Raudono dažo – DNP (dinitrofenilo) (High) didelis intensyvumas, kitų trijų dažų – fono intensyvumas	Žalio dažo – biotino (High) – didelis intensyvumas, kitų trijų – fono intensyvumas
Nukleotido bazės pratęsimas	
A, T – didelis, G, C – fono intensyvumas	G, C – didelis, A, T – fono intensyvumas
Taikinio pašalinimas	
Vertinama tik žalio dažo sistemoje, todėl signalų intensyvumas yra foninio lygmens	Foninio lygmens intensyvumas
Hibridizacija	
Vertinama tik žalio dažo sistemoje, todėl signalų intensyvumas yra foninio lygmens	Trys DNR koncentracijų lygiai: juodas – mažas, mėlynas – tarpinis, žalias – didelis
Atkūrimas	
Vertinama tik žalio dažo sistemoje. Intensyvumas foninio lygmens	Intensyvumas foninio lygmens
<b>Nuo mėginio priklausomi rodikliai</b>	
Hibridizacijos proceso tikslumas	
Hibridizacijos proceso tikslumui vertinti naudojami kriterijai: PM (Perfect Match) – visiškas atitikimas; MM (Miss–Match) – neatitikimas. Vertinama tik raudono dažo sistemoje. PM – didelis, MM – fono intensyvumas	Vertinama tik raudono dažo sistemoje, todėl PM ir MM yra foninio lygmens
Specifiškumas	
Intensyvumas foninio lygmens	Intensyvumas foninio lygmens
Polimorfiškumas	
A, T – didelis, G, C – foninio lygmens	C, G – didelis, A, T – foninio lygmens

3.3.1.4. Rezultatų interpretavimas ir bioinformacinė analizė

Tolesnei rezultatų analizei buvo atrinkti KSP, kurie atitiko kokybės kontrolės kriterijus. KSP nustatymo kokybės kontrolės rodikliai ir jų reikšmės pateikiamos 3.2 lentelėje. Buvo atrenkami KSP, kurie nustatyti abiem KSP nustatymo programomis – *QuantiSNP v2.1* ir *PennCNV-1.0.4*: kaip ekvivalentiški KSP buvo vertinami tie KSP, kurių ilgis abiejose programose sutapo  $\geq 60$  %. Atliekant KSP nustatymą VNPLGH metodu, subalansuotų

struktūrinių genomo persitvarkymų (subalansuotų translokacijų ir inversijų) bei taškinių mutacijų nėra nustatoma.

Nustatytų KSP – delecijų ir duplikacijų – klinikinei reikšmei įvertinti buvo atlikta bioinformacinė duomenų analizė. Pirminė bioinformacinė duomenų analizė atlikta naudojant *Database of Genomic Variants (DGV)* [Iafate *et al.*, 2004; Vermeesch *et al.*, 2005; MacDonald *et al.*, 2014] duomenų bazę. Remiantis ACMG rekomendacijomis (aprašytomis 2.8.1 skyriuje), nustatyti KSP buvo skirstomi į kelias kategorijas [Kearney *et al.*, 2011]:

- **normalus KSP** – kai KSP sutampa su normaliai populiacijai būdingais KSP, aprašytais DGV duomenų bazėje, ir yra dažnas polimorfizmas, t. y. nustatomas >1 proc. populiacijos;
- **patogeninis KSP** – kai KSP sutampa su minimalia kritine žinomo mikrodelecijos ar mikroduplikacijos sindromo sritimi arba kai KSP apima dozei jautrų geną, siejamą su tiriamojo fenotipu;
- **neaiškios klinikinės reikšmės, galimai patogeninis KSP** – kai KSP nesutampa su normaliai populiacijai būdingais KSP, aprašytais DGV duomenų bazėje, arba kai apima geną, siejamą su tiriamojo fenotipu, tačiau geno jautrumas dozei yra neaiškus.

Tyrimo rezultatas aprašomas remiantis ISCN rekomendacijomis [McGowan-Jordan *et al.*, 2016].

KSP savybėms ir dažniui palyginti tiriamojoje ir kontrolinėje grupėse (4.6 skyrius) nustatyti KSP buvo skirstomi į dažnus KSP ir retus KSP pagal KSP sanklotą su normaliai populiacijai būdingais KSP. KSP, kurie >70 % sutapo su bent vienu DGV duomenų bazėje pateiktu KSP, buvo interpretuojami kaip **dažni KSP**. KSP, kurie iš dalies (<30 %) sutapo arba nesutapo su DGV duomenų bazėje pateiktais KSP, buvo interpretuojami kaip **reti KSP**. Reti KSP buvo atrenkami tolesnei analizei.

Patogeninių KSP, neaiškios klinikinės reikšmės, galimai patogeninių KSP ir retų KSP patogeniškumas vertintas naudojant duomenų bases *Decipher* [Bragin *et al.*, 2014], *ClinGen* [<https://www.clinicalgenome.org/>] ir *ClinGen Dosage Sensitivity Map* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/dbvar/clingen/>). Nustatytų genomo pokyčių patogeniškumas taip pat buvo vertintas naudojant duomenų bases *NCBI OMIM* [Amberger *et al.*, 2015], *ECARUCA* [Feenstra *et al.*, 2006] ir *ENSEMBL* [Ruffier *et al.*, 2017], *UCSC* [Tyner *et al.*, 2017] genomo naršykles bei remiantis mokslinės literatūros duomenimis. Buvo analizuojami genai, patenkantys į patogeninio ar galimai patogeninio KSP sritį. Vertinta pokyčio srityje esančių genų, dalyvaujančių širdies vystymesi, funkcija.

3.2 lentelė. KSP nustatymo kokybės kontrolės rodikliai ir jų reikšmės / reikšmių intervalai

Tyrimo etapas	Kokybės kontrolės rodikliai	Kokybės kontrolės rodiklių reikšmės / reikšmių intervalai
<b>Genotipavimas</b>	Genotipų kokybės klasifikavimo santykis (angl. <i>Call Rate</i> )	>99
	Fluorescencijos intensyvumo (R) logaritminio įverčio standartinis nuokrypis (angl. <i>LogRDev</i> )	<0,3
<b>KSP nustatymas</b>	Max LogBF	>30
	Standartinio LogR santykio nuokrypio (angl. <i>Standard deviation LogR ratio</i> (St.Dev.LRR)) reikšmės priklauso intervalui	[0,1 – 0,25]
	Standartinio B alelio dažnio nuokrypio (angl. <i>Standard deviation of B allele frequency</i> (St.Dev.BAF)) reikšmės priklauso intervalui	[0,025 – 0,04]
	VNP skaičius, patenkantis į deleciją	>10
	VNP skaičius, patenkantis į duplikaciją	>20
	Delecijos dydis (kb)	>30
	Duplikacijos dydis (kb)	>50
Duplikacijos sanklota su žinomomis segmentinėmis duplikacijomis	<50%	

#### 3.4. Kontrolinės grupės genotipavimų tyrimų duomenų rinkimas

Kontrolinės grupės, kurią sudarė LITGEN biomedicinio tyrimo etninė sveikų lietuvių populiacijos asmenų grupė, genotipavimas VNP-LGH metodu buvo atliktas 2011–2013 m. VU MF ŽMGK darbuotojų.

Kontrolinės grupės tiriamųjų genomine DNR buvo išskirta iš 10 ml veninio kraujo, naudojant fenolio ir chloroformo išskyrimo metodą arba automatizuotą branduolio rūgščių išgryninimo sistemą (*TECAN Freedom EVO® 200, Tecan Schweiz AG, Šveicarija*). VNP genotipavimas atliktas 770K *HumanOmniExpress-12 v1.0* ir *HumanOmniExpress-12 v1.1* lustais (Illumina, Inc., JAV) *Infinium® HD* technologija pagal gamintojo pateiktą protokolą (angl. *Infinium® HD Assay Ultra Manual Experienced User Card*). *HumanOmniExpress-12 v1.0* ir *HumanOmniExpress-12 v1.1* lustų

charakteristikos: 730525 VNP padengimas per genomą, vidutinė 4 kb skiriamoji geba. Genotipavimui naudota *Illumina HiScan<sup>TM</sup> SQ* (*Illumina, Inc., JAV*) naujos kartos didelio našumo genomo analizės sistema.

### 3.5. Patogeninių / galimai patogeninių pokyčių tvirtinimas ir kilmės nustatymas

Nustatyti patogeniniai / galimai patogeniniai genominiai pokyčiai buvo tvirtinami kitais genetiniais metodais, atsižvelgiant į nustatyto KSP lokalizaciją genome ir KSP dydį. VNP-LGH metodu (3.3.1 skyrius) arba kitais genetiniais tyrimo metodais buvo atliekami KSP kilmės patvirtinimo tyrimai tėvams. Nustatytas pokytis gali būti *de novo* kilmės arba paveldėtas iš vieno iš tėvų. Toliau pateikiami patogeniniams / galimai patogeniniams pokyčiams tvirtinti ir kilmei nustatyti naudoti genetiniai metodai:

- *citogenetiniai tyrimai* buvo atliekami, kai tiriamajam įtarta chromosomų (autosomų ar lytinių chromosomų) skaičiaus patologija, arba VNP-LGH tyrimo rezultatui patvirtinti. Nustačius tiriamajam nesubalansuotą translokaciją, citogenetinė analizė buvo atliekama tiriamajam VNP-LGH tyrimo rezultatui patvirtinti ir jo tėvams pokyčio kilmei nustatyti ir subalansuotos translokacijos nešiojo statusui įvertinti. Tyrimai atlikti pagal VŠĮ VUL SK generalinio direktoriaus patvirtintą diagnostikos protokolą „Žmogaus kariotipo nustatymas kraujo limfocitų kultūroje“. Chromosominiai preparatai analizuoti šviesiniu mikroskopu, naudojant kompiuterizuotą *CytoVision* vaizdų analizės sistemą (Leica Biosystems, Vokietija). Kariotipas aprašomas remiantis ISCN rekomendacijomis [McGowan-Jordan *et al.*, 2016]. Kariotipo analizė atlikta 16-ai tiriamųjų ir 4-ių tiriamųjų tėvams.
- *FISH* (Fluorescencinė *in situ* hibridizacija) tyrimai buvo atliekami tiriamajam VNP-LGH tyrimo rezultatui patvirtinti ir tiriamojo tėvams (tam tikrais atvejais ir tiriamojo sibsams) pokyčio kilmei nustatyti. Kiekvienu individualiu atveju buvo naudojami patogeninių variantų genominiams sritims specifiniai žymenys. Keturių tiriamųjų tėvams buvo atliktas FISH tyrimas patogeninio pokyčio kilmei nustatyti. Dviem atvejais kilmės nustatymo tyrimas atliktas vienam iš tėvų, todėl patogeninio pokyčio kilmė tiriamajam nebuvo nustatyta. FISH tyrimai atlikti pagal VŠĮ VUL SK generalinio direktoriaus patvirtintą diagnostikos protokolą „Chromosomų mikrodelecijų tyrimas fluorescencinės *in situ* hibridizacijos metodu“. FISH tyrimams naudoti komerciniai žymenys (Cytocell, Cambridge, D.Britnija;



Abbott Molecular, Des Plaines, IL, JAV) arba žymėti BAC klonai iš RP11 bibliotekos (Centre for Applied Genomics, Hospital for Sick Children, Toronto, ON, Kanada), atrinkti naudojant UCSC genominę naršyklę ir NCBI žmogaus genomo GRCh37/hg19 anotaciją. Chromosomos ir žymenų signalai vizualizuoti fluorescenciniu mikroskopu *Nicon Eclipse 80i* (Nicon, Japonija) su CCD kamera (JAI, Japonija), naudojant LUCIA v2 vaizdų analizės programą.

- *TL-PGR* (Tikro laiko – polimerazės grandininė reakcija) tyrimai buvo atliekami tiriamajam VNP-LGH tyrimo rezultatui patvirtinti ir tiriamojo tėvams pokyčio kilmei nustatyti. TL-PGR tyrime naudoti nustatytų patogeninių ar galimai patogeninių pokyčių sritims specifiniai oligonukleotidiniai pradmenys, sukurti naudojant *Primer3v0.4.0* programą [Untergasser *et al.*, 2012]. Atlikus TL-PGR vienai tiriamajai ir jos tėvams, VNP-LGH metodu nustatytas pokytis buvo patvirtintas ir nustatyta jo kilmė.
- *Dauginė liguojamų zonų amplifikacija*. SALSA MLPA P015-F1 rinkiniu buvo analizuotas nustatyto patogeninio varianto genominiame srityje esančių genų egzonų kopijų skaičius. Tyrimai atlikti pagal VšĮ VUL SK generalinio direktoriaus patvirtintą diagnostikos protokolą „Subtelomerinių chromosomų sričių delecijų / duplikacijų tyrimas MLPA metodu“. Atlikus MLPA vienai tiriamajai ir jos tėvams, VNP-LGH metodu nustatytas pokytis buvo patvirtintas ir nustatyta jo kilmė.

### 3.6. Naujų ĮŠY genų kandidatų nustatymas

Naujų ĮŠY genų kandidatų paieškai nustatytuose patogeniniuose KSP buvo naudota keletas bioinformacinių įrankių ir internetinių duomenų šaltinių. Genų prioritetizavimas atliktas naudojant *ToppGene* programą [Chen *et al.*, 2009]. Pelių širdies embriogenezės genų raiškos modeliai analizuoti naudojant *Gene Expression Database (GXD) in Mouse Genome Informatics (MGI)* (<http://www.informatics.jax.org/expression.shtml/>) duomenų bazę.

### 3.7. Biostatistinė analizė

Statistinė duomenų analizė atlikta naudojant atvirojo kodo programą R, versiją 3.4.3 (<http://www.R-project.org/>) ir MS Excel 2016 skaičiuoklę.

Vertinant kiekybinius rodiklius buvo skaičiuojamas aritmetinis vidurkis  $\bar{x}$ . Jis yra tam tikro reiškinio vidutinė stebėjimų reikšmė, kuri skaičiuojama

pagal formulę  $\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n x_j$ . Buvo skaičiuojama ir mediana. Mediana – skaičius, perskiriamas variacinę eilutę į dvi maždaug lygias dalis. Kaip ir mediana, aritmetinis vidurkis apibūdina duomenų centrą, tačiau jis jautrus išskirtims. Išskirtis – tokia duomenų aibės reikšmė, kuri yra nenatūraliai didesnė ar mažesnė už kitas reikšmes. Kai duomenų aibėje yra išskirčių, rekomenduojama naudoti medianą. Taip pat buvo skaičiuojamas standartinis nuokrypis (s). Tai dydis, nusakantis atsitiktinio dydžio įgyjamų reikšmių sklaidą apie vidurkį. Jis skaičiuojamas pagal formulę:  $s = \sqrt{1/(n-1) \sum_{j=1}^n (x_j - \bar{x})^2}$ , čia n – imties dydis.

Tiriamųjų IŠY su normaliomis širdies segmentinėmis jungtimis duomenys palyginti su tiriamųjų IŠY su nenormaliomis širdies segmentinėmis jungtimis naudojant  $\chi^2$  kriterijų. Esant mažam stebėjimų skaičiui arba kai nors vienas tikėtinas stebėjimų skaičius mažiau kaip penki, papildomai buvo skaičiuojamas tikslus Fišerio kriterijus.  $\chi^2$  kriterijus parodo, ar empirinio ir teorinio skirstinių skirtumas yra reikšmingas, t. y. tikrinama, ar turimas empirinis skirstinys suderinamas su teoriniu modeliu.  $\chi^2$  kriterijaus reikšmė skaičiuojama 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 skaičius, lygus kryžminės lentelės eilučių ir stulpelių sandaugai.

Hipotezėms apie kintamojo skirstinio normalumą patikrinti buvo naudojamas *Shapiro-Wilk* testas bei grafiniai būdai, t. y. histograma ir stačiakampė diagrama.

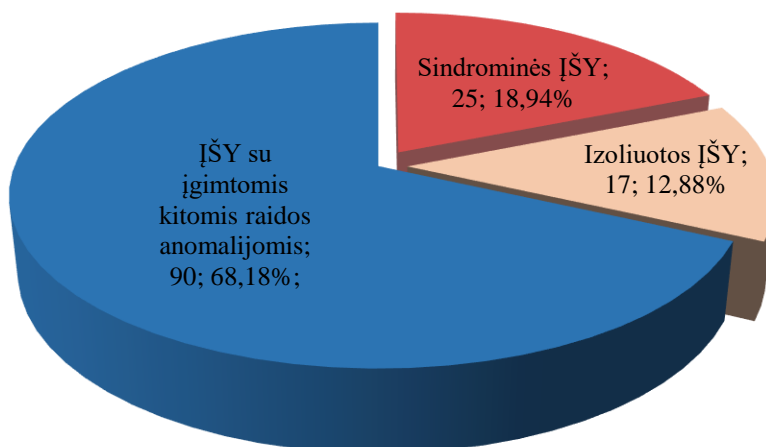
Dviem priklausomoms imtims palyginti taikytas *Wilcoxon* kriterijus, o nepriklausomų imčių – *Mann-Whitney-Wilcoxon* rangų sumų kriterijus. Trims priklausomoms imtims palyginti taikytas *Friedman* kriterijus, nepriklausomoms imtims palyginti – *Kruskal-Wallis* ranginis kriterijus.

## 4. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

### 4.1. Įgimtų širdies ydų pasiskirstymas tiriamųjų grupėje

Remiantis tiriamųjų asmenų atrankos kriterijais, nurodytais 3.1 skyriuje, į tiriamųjų grupę buvo įtraukti 132 asmenys.

Tiriamųjų grupė buvo suskirstyta į tris grupes: 1) tiriamieji, turintys izoliuotą ĮŠY; 2) tiriamieji, turintys ĮŠY ir kitas įgimtas raidos anomalijas ir / ar dismorfinius požymius; 3) tiriamieji, turintys ĮŠY ir genetiniam sindromui būdingą fenotipą. Apibūdinimas „izoliuota ĮŠY“ buvo vartotas tais atvejais, kai diagnozės nustatymo metu pagrindinis paciento fenotipinis požymis buvo įgimta širdies yda. Atitinkamai apibūdinimas „ĮŠY su kitomis įgimtomis raidos anomalijomis ir / ar dismorfinais požymiais“ buvo vartotas tais atvejais, kai pacientui diagnozuota ĮŠY ir kitos įgimtos raidos anomalijos ir / ar dismorfiniai požymiai, tačiau pacientui nebuvo diagnozuotas genetinis sindromas. Apibrėžtimi „ĮŠY ir genetiniam sindromui būdingas fenotipas“ apibūdinami atvejai, kai ĮŠY ir kitas įgimtas raidos anomalijas turinčiam pacientui buvo įtartas genetinis sindromas, remiantis tik paciento fenotipu.



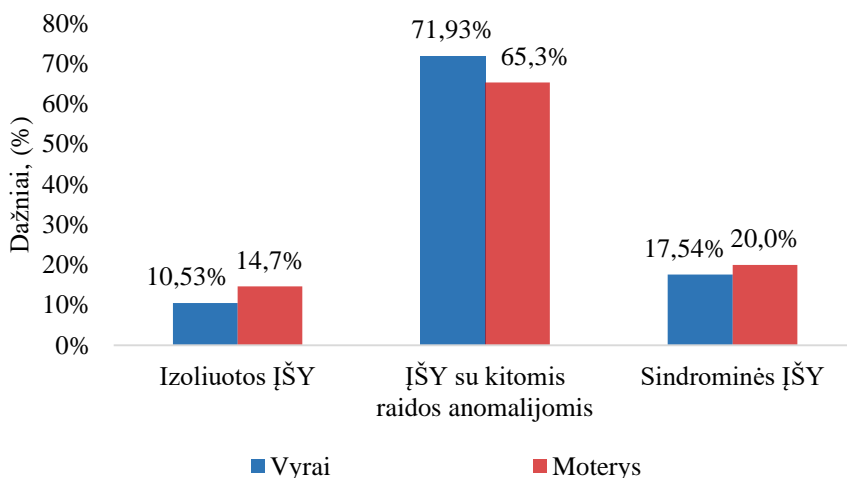
4.1 paveikslas. Tiriamųjų grupės pasiskirstymas pagal įgimtas širdies ydas

Izoliuotą ĮŠY turinčių tiriamųjų grupę sudarė 17/132 (12,88 proc.) asmenų; tiriamųjų, turinčių ĮŠY ir kitas įgimtas raidos anomalijas ir / ar dismorfinius požymius, grupę – 90/132 (68,18 proc.) asmenų; tiriamųjų,

turinčių IŠY ir genetiniam sindromui būdingą fenotipą, grupę – 25/132 (18,94 proc.) asmenys (4.1 paveikslas).

Įvertinus tiriamųjų, turinčių IŠY ir kitas įgimtas raidos anomalijas ir / ar dismorfinius požymius, fenotipą, buvo nustatyta, kad dažniausi klinikiniai požymiai buvo fizinės ir psichomotorinės raidos atsilikimas, mikroanomalijos ir kitų organų sistemų įgimtos vystymosi ydos. O tiriamųjų, turinčių IŠY ir genetiniam sindromui būdingą fenotipą, grupėje, be minėtų klinikių simptomų, papildomai buvo nustatyta intelektinė negalia.

Iš 132 tiriamųjų 57 (43,18 proc.) buvo vyrai ir 75 (56,82 proc.) – moterys. Palyginus tiriamųjų pasiskirstymą pagal lytį izoliuotų IŠY grupėje, IŠY ir kitų įgimtų raidos anomalijų grupėje bei sindrominių IŠY grupėje, vyrų ir moterų dažnis visose grupėse statistiškai reikšmingai nesiskyrė ( $p = 0,690$ ) (4.2 paveikslas).



#### 4.2 paveikslas. Tiriamųjų pasiskirstymas pagal lytį skirtingose IŠY grupėse

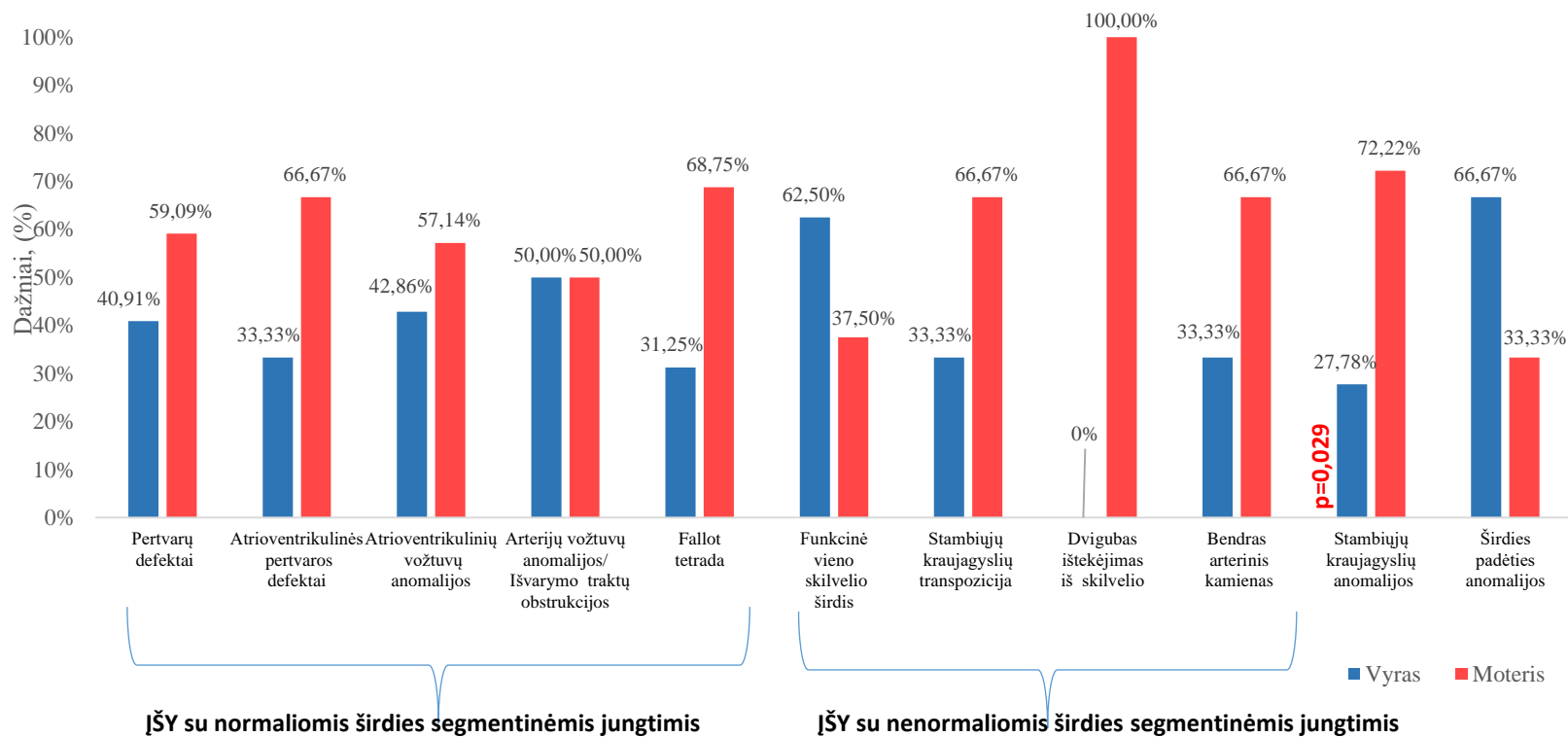
Remiantis patomorfolagine IŠY klasifikacija (aprašyta 2.5 skyriuje), tiriamųjų grupės IŠY suskirstytos į keturias kardiologinių fenotipų grupes, iš kurių dvi grupės padalytos į mažesnius pogrupius (2 priedas). Tiriamųjų grupėje nustatytos 189 įgimtos širdies ydos (39 tiriamieji turėjo kompleksines IŠY) (4.1 lentelė). Didžiausią grupę sudarė IŠY su normaliomis širdies segmentinėmis jungtimis – 135/189 (71,43 proc.) širdies ydos, IŠY su nenormaliomis širdies segmentinėmis jungtimis grupę sudarė 15/189 (7,94 proc.) širdies ydų, stambiųjų kraujagyslių anomalijų grupę – 36/189 (19,05 proc.) širdies ydos ir širdies padėties anomalijų grupę – 3/189 (1,59 proc.) širdies padėties anomalijos. Tarp visų širdies anomalijų didžiausią dalį sudarė pertvarų defektai – 66/189 (34,92 proc.) atvejai.

4.1 lentelė. Kardiologinių fenotipų dažnių pasiskirstymas

<b>ĮŠY morfologinės grupės</b>	<b>Kardiologinių fenotipų pogrupiai</b>	<b>Dažniai</b>	<b>Santykiniai dažniai (%)</b>
<b>ĮŠY su normaliomis širdies segmentinėmis jungtimis</b>	Pertvarų defektai	66	34,92
	Atrioventrikulinės pertvaros defektai	6	3,17
	Atrioventrikulinių vožtuvų anomalijos	21	11,11
	Arterijų vožtuvų anomalijos / išvaymo traktų obstrukcijos	26	13,76
	Tetrada Fallot	16	8,46
<b>Iš viso:</b>		135	–
<b>ĮŠY su nenormaliomis širdies segmentinėmis jungtimis</b>	Funkcinė vieno skilvelio širdis	8	4,23
	Stambiųjų kraujagyslių transpozicija	3	1,6
	Dvigubas ištekėjimas iš skilvelio	1	0,5
	Bendras arterinis kamienas	3	1,6
<b>Iš viso:</b>		15	–
<b>Stambiųjų kraujagyslių anomalijos</b>		36	19,05
<b>Širdies padėties anomalijos</b>		3	1,6
<b>Iš viso:</b>		<b>189</b>	<b>100</b>

Analizuojant ĮŠY pasireiškimo priklausomybę nuo lyties ĮŠY su normaliomis širdies segmentinėmis jungtimis grupėje, reikšmingos priklausomybės nuo lyties nebuvo nustatyta ( $p > \alpha$ ,  $\alpha = 0,05$ ) ( $p = 0,598$  pertvarų defektų pogrupyje,  $p = 0,698$  atrioventrikulinės pertvaros defektų pogrupyje,  $p = 0,974$  atrioventrikulinių vožtuvų anomalijų pogrupyje,  $p = 0,434$  arterijų vožtuvų anomalijų / išvaymo traktų obstrukcijų pogrupyje ir  $p = 0,304$  tetrados Fallot pogrupyje) (4.3 paveikslas).

ĮŠY su nenormaliomis širdies segmentinėmis jungtimis grupėje funkcinės vieno skilvelio širdies ( $p = 0,291$ ) ir bendro arterinio kamieno ( $p = 0,100$ ) pogrupiuose reikšminga priklausomybė nuo lyties nenustatyta ( $p > \alpha$ ,  $\alpha = 0,05$ ).



4.3 paveikslas. Kardiologinių fenotipų pasiskirstymas tarp lyčių

Statistiškai reikšminga nustatyta stambiųjų kraujagyslių anomalijų pasireiškimo ir lyties priklausomybė ( $p = 0,029$ ,  $p < \alpha$ ,  $\alpha = 0,05$ ) (4.3 paveikslas). Moterų grupėje, palyginti su vyrų grupe, stambiųjų kraujagyslių anomalijų buvo dažniau – nustatyti 26 (72,22 proc.) atvejai moterų grupėje ir 10 (27,78 proc.) atvejų vyrų grupėje.

Siekiant įvertinti kardiologinių fenotipų pasiskirstymą tiriamųjų grupėje, suskirstytoje pagal ĮŠY raiškos tipus, buvo apskaičiuoti kardiologinių fenotipų dažniai (4.2 lentelė). Didžiausias ĮŠY dažnis nustatytas ĮŠY ir kitų įgimtų raidos anomalijų ir / ar dismorfinių požymių grupėje – 133/189 (70,37 proc.) širdies anomalijos, izoliuotų ĮŠY grupėje buvo nustatytos 24/189 (12,7 proc.) širdies anomalijos, sindrominių ĮŠY grupėje – 32/189 (16,93 proc.) širdies anomalijos. Pertvaros defektai ir stambiųjų kraujagyslių anomalijos sudarė didžiausią dalį ĮŠY ir kitų įgimtų raidos anomalijų ir / ar dismorfinių požymių grupėje – 46/133 (34,59 proc.) ir 31/133 (23,31 proc.) atitinkamai. Izoliuotų ĮŠY grupėje daugiausia diagnozuota pertvaros defektų ir tetradą Fallot atvejų (6 anomalijos) – 8/24 (33,33 proc.) ir 6/24 (25 proc.). Sindrominių ĮŠY grupėje daugiausia buvo pertvaros defektų – 12/32 (37,5 proc.) anomalijų – ir arterijų vožtuvų anomalijų / išvaymo traktų obstrukcijos atvejų – 6/32 (18,75 proc.) anomalijos.

Palyginus TF dažnį tarp grupių, nustatyta, kad TF buvo dažniausiai pasireiškianti širdies yda ĮŠY ir kitų įgimtų raidos anomalijų ir / ar dismorfinių požymių grupėje: 7/16 (43,75 proc.) atvejai ĮŠY ir kitų įgimtų raidos anomalijų ir / ar dismorfinių požymių grupėje, 6/16 (37,5 proc.) atvejai izoliuotų ĮŠY grupėje ir 3/16 (18,75 proc.) atvejai sindrominių ĮŠY grupėje), ir šis skirtumas buvo statistiškai reikšmingas ( $p = 0,006$ ). Stambiųjų kraujagyslių anomalijos buvo reikšmingai dažniau ( $p = 0,020$ ) diagnozuotos tiriamiesiems, turintiems ir kitų įgimtų raidos anomalijų ir / ar dismorfinių požymių (31/36 (86,1 proc.) atvejais ĮŠY ir kitų įgimtų raidos anomalijų ir / ar dismorfinių požymių grupėje, 1/36 (2,8 proc.) atvejais izoliuotų ĮŠY grupėje ir 4/36 (11,1 proc.) atvejais sindrominių ĮŠY grupėje). Statistiškai nereikšmingas buvo pertvaros defektų, atrioventrikulinių vožtuvų anomalijų ir arterijų vožtuvų anomalijų / išvaymo traktų obstrukcijų pasiskirstymas grupėse pagal ĮŠY pasireiškimą ( $p = 0,931$ ,  $p = 0,937$ ,  $p = 0,350$  atitinkamai). Nenustatyta ir širdies padėties anomalijų pasiskirstymo tarp grupių pagal ĮŠY pasireiškimą ( $p = 0,419$ ) reikšmingų skirtumų (4.2 lentelė).

4.2 lentelė. Kardiologinių fenotipų dažnių pasiskirstymas tiriamųjų grupėje, suskirstytoje pagal ĮŠY pasireiškimą

ĮŠY morfologinės grupės	Kardiologinių fenotipų pogrupiai	Izoliuotos ĮŠY	ĮŠY su kitomis įgimtomis raidos anomalijomis ir /ar	Sindrominės ĮŠY	p reikšmė
ĮŠY su normaliomis širdies segmentinėmis jungtimis	Pertvarų defektai	8	46	12	0,931
	Atrioventrikulinės pertvaros defektai	0	5	1	–
	Atrioventrikulinių vožtuvų anomalijos	3	14	4	0,937
	Arterijų vožtuvų anomalijos / išvaymo traktų obstrukcijos	5	15	6	0,350
	Tetrada Fallot	6	7	3	<b>0,006</b>
ĮŠY su nenormaliomis širdies segmentinėmis jungtimis	Funkcinė vieno skilvelio širdis	0	6	2	0,734
	Stambiųjų kraujagyslių transpozicija	0	3	0	–
	Dvigubas ištekėjimas iš skilvelio	0	1	0	–
	Bendras arterinis kamienas	0	3	0	–
Stambiųjų kraujagyslių anomalijos	1	31	4	<b>0,020</b>	
Širdies padėties anomalijos	1	2	0	0,419	
<b>Iš viso:</b>		24	133	32	

Paryškintu šriftu pažymėtos statistiškai reikšmingos p reikšmės,  $p > \alpha$ ,  $\alpha = 0,05$



Pagal IŠY kompleksiskumą jos buvo suskirstytos į dvi grupes: 1) paprastos IŠY, apibūdinamos kaip anatomiškai izoliuotos IŠY (pvz., PPD, SPD ir kitos); šiai grupei priskirta sudėtinė širdies yda tetrada Fallot; 2) kompleksinės IŠY, apibūdinamos kaip skirtingų širdies ydų kompleksas; šiai grupei priskirta funkcinė vieno skilvelio širdis [Botto *et al.*, 2007]. Kompleksinės IŠY gali būti unikalios, t. y. būdingos tik vienam IŠY turinčiam asmeniui. Įvertinus kardiologinių fenotipų pasiskirstymą tarp tiriamųjų pagal širdies ydų kompleksiskumą, nustatyta, kad paprastų IŠY grupę sudarė 93/189 (49,21 proc.) širdies anomalijos, kompleksinių IŠY grupę – 96/189 (50,79 proc.) širdies anomalijos (4.3 lentelė). Tiek paprastų, tiek kompleksinių IŠY grupėse didžiausią širdies anomalijų dalį sudarė pertvarų defektai – 42/93 (45,16 proc.) ir 24/96 (25 proc.) atitinkamai.

4.3 lentelė. Kardiologinių fenotipų dažnių pasiskirstymas pagal IŠY kompleksiskumą

IŠY morfologinės grupės	Kardiologinių fenotipų pogrupiai	Paprastos IŠY	Kompleksinės IŠY	p reikšmė
IŠY su normaliomis širdies segmentinėmis jungtimis	Pertvarų defektai	42	24	<b>0,011</b>
	Atrioventrikulinės pertvaros defektai	0	6	–
	Atrioventrikulinių vožtuvų anomalijos	5	16	<b>&lt;0,001</b>
	Arterijų vožtuvų anomalijos / išvaymo traktų obstrukcijos	14	12	0,247
	Tetrada Fallot	13	3	<b>0,012</b>
	IŠY su nenormaliomis širdies segmentinėmis jungtimis	Funkcinė vieno skilvelio širdis	3	5
Stambųjų kraujagyslių transpozicija		1	2	–
Dvigubas ištekėjimas iš skilvelio		0	1	–
Bendras arterinis kamienas		1	2	–
Stambųjų kraujagyslių anomalijos		14	22	<b>&lt;0,001</b>
Širdies padėties anomalijos	0	3	–	
<b>Iš viso:</b>		<b>93</b>	<b>96</b>	

Paryškintu šriftu pažymėtos statistiškai reikšmingos p reikšmės,  $p > \alpha$ ,  $\alpha = 0,05$

Ištirus IŠY su normaliomis širdies segmentinėmis jungtimis grupės fenotipinius ypatumus, nustatyta, kad pertvarų defektai buvo dažnesni paprastų IŠY grupėje, palyginti su kompleksinėmis IŠY (63,64 proc. paprastų IŠY grupėje ir 36,36 proc. kompleksinių IŠY grupėje), ir šis skirtumas buvo statistiškai reikšmingas ( $p = 0,011$ ) (4.3 lentelė). Tetradą Fallot reikšmingai dažniau pasireiškė (81,25 proc. paprastų IŠY grupėje ir 18,75 proc. kompleksinių IŠY grupėje) paprastų IŠY grupėje, palyginti su kompleksinių IŠY grupe ( $p = 0,012$ ). Paprastų IŠY grupėje, palyginti su kompleksinių IŠY grupe, dažniau buvo arterijų vožtuvų anomalijos / išvaymo traktų obstrukcijos (53,85 proc. paprastų IŠY grupėje ir 46,15 proc. kompleksinių IŠY grupėje), tačiau šis skirtumas nebuvo reikšmingas ( $p = 0,247$ ). Atrioventrikulinių vožtuvų anomalijos buvo reikšmingai dažnesnės kompleksinių IŠY grupėje, palyginti su paprastų IŠY grupe ( $p < 0,001$ ).

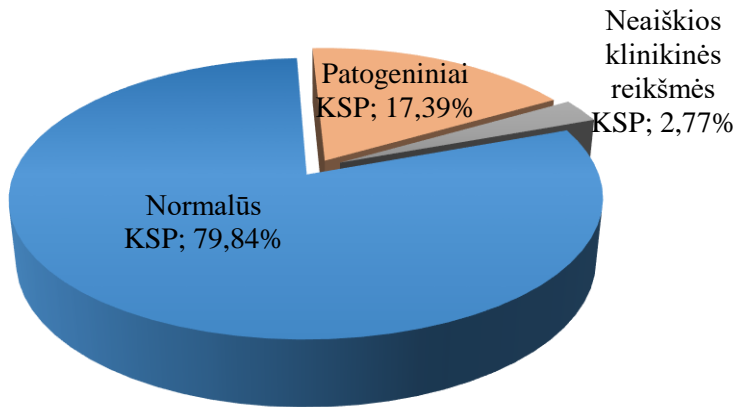
IŠY su nenormaliomis širdies segmentinėmis jungtimis grupėje funkcinė vieno skilvelio širdis dažniau buvo su kitomis širdies anomalijomis (37,50 proc. paprastų IŠY grupėje ir 62,50 proc. kompleksinių IŠY grupėje), ir šis skirtumas buvo reikšmingas ( $p = 0,011$ ). Kitos širdies anomalijos – stambiųjų kraujagyslių transpozicija, dvigubas ištekėjimas iš skilvelio ir bendras arterinis kamienas – pavieniai atvejai paprastų IŠY ir kompleksinių IŠY grupėse. Atlikus lyginamąją analizę, nustatytas reikšmingas skirtumas tarp paprastų IŠY ir kompleksinių IŠY grupių pagal stambiųjų kraujagyslių anomalijų dažnį. Šios anomalijos buvo dažnesnės kompleksinių IŠY grupėje (38,89 proc. paprastų IŠY grupėje ir 61,11 proc. kompleksinių IŠY grupėje) ( $p < 0,001$ ) (4.3 lentelė).

#### 4.2. KSP nustatymas tiriamųjų grupėje

Plataus masto VNP-LGH genotipavimas buvo atliktas 132 tiriamiesiems. Iš viso tiriamiesiems buvo nustatyti 253 KSP, atitinkantys KSP nustatymo kriterijus (aprašyta 3.3.1.4 skyriuje). Tiriamojoje grupėje nustatytų KSP dydis varijavo nuo 21 kb iki 94 440 kb, KSP dydžio mediana – 286 kb. Remiantis ACMG rekomendacijomis [Kearney *et al.*, 2011], 202/253 (79,84 proc.) KSP buvo klasifikuoti kaip normalūs variantai, **44/253 (17,39 proc.) – patogeniniai variantai** ir 7/253 (2,77 proc.) – neaiškios klinikinės reikšmės, galimai patogeniniai variantai (4.4 paveikslas).

146/202 normalūs genominiai KSP >70 proc. pokyčio ilgio sutapo su žinomais kopijų skaičiaus polimorfizmais, pateiktais *Decipher* ir *DGV* duomenų bazėse [Bragin *et al.*, 2014; MacDonald *et al.*, 2014], ir 56/202 normalūs genominiai KSP sutapo su pericentrinėmis chromosomų sritimis ar geno sritimis, neturinčiomis referentinės sekos baltymus koduojančių

genų. Iš viso 88/132 (65,90 proc.) tiriamiesiems nustatyti KSP buvo priskirti normaliems genominiams variantams.



#### 4.4 paveikslas. KSP tyrimo rezultatai tiriamųjų grupėje

Patogeniniai KSP buvo nustatyti 39/132 (29,55 proc.) tiriamiesiems, iš kurių penkiems tiriamiesiems (3,79 proc.) genome buvo nustatyta po du patogeninius KSP (4.4. lentelė). Iš viso nustatyti 44/253 (17,39 proc.) patogeniniai KSP (3 priedas). Patogeninius KSP sudarė 34/44 (77,27 proc.) delecijos ir 10/44 (22,73 proc.) duplikacijų.

4.4 lentelė. Patogeniniai KSP, nustatyti tiriamojame grupėje

Eil. Nr.	Tiriamąjo IN	Lytis	KSP	Chromosomos sritis	Pokyčio pradžia*	Pokyčio pabaiga*	KSP dydis (kb)
1.	CG-007	M	Del	22q11.21	19068642	21339751	2271
2.	CG-010	M	Del	10q22.3q23.33	81388196	95542677	14154
3.	CG-017	M	Dup	2q34	212159787	212766614	607
4.	CG-018	M	Del	4q13.3	72647749	74208199	1560
5.	CG-019	M	Del	5p15.33q13.3	1176601	31541142	30365
6.	CG-037	M	Del	1p36.22p36.32	4236982	12602979	8366
7.	CG-039	V	Del	15q11.2	22754322	23066736	312
8.	CG-040	V	Del	22q11.21	19204210	21312429	2108
9.	CG-044	M	Del	18q22.1q23	65094544	78014582	12920
10.	CG-051	M	Del	4p16.3p16.1	85800	6523395	6438
11.	CG-052	V	Del	2q37.1q37.3	234819199	243029573	8210
12.	CG-061	M	Del	16q24.3	89243584	89596063	352
13.	CG-062	M	Del	7q11.23	73172999	74050694	878
14.	CG-067	M	Del	1q22q23.1	155630752	157193893	1563
15.	CG-070	M	Dup	14q23.1	60652103	61536933	885
16.	CG-072	M	Del	1p36.11p35.3	27862451	29004746	1142
17.	CG-074	M	Del	22q13.31q13.33	44286531	51105556	6819
18.	CG-084	M	Del	1q42.3q44	235827443	249202755	13375
19.	CG-089	M	Del	6q27	167615010	171115067	3500
20.	CG-090	V	Del	13q12.11 q12.12	20079051	25441945	5363
21.	CG-092	M	Del	7q11.23	72722981	74138121	1415
22.	CG-093	M	Del	22q11.21	18844632	21462353	2618
23.	CG-097	M	Dup	1q21.1q21.2	146476526	147820342	1344
24.	CG-099	V	Del	15q11.2	22754322	23080702	326
25.	CG-107	V	Dup	7q11.23	72773966	74138121	1364
26.	CG-109	V	Dup	11p15.5 14q12	419167 29887615	900809 30208568	482 321
27.	CG-112	M	Del	18q23	76881798	78014582	1133
28.	CG-113	V	Del	4p16.3p16.1	85800	8728783	8643
29.	CG-116	V	Del	7q11.22q11.23	72722981	74138121	1415
30.	CG-117	M	Del	4p16.3p15.2	85800	21866646	21781
31.	CG-118	V	Del	15q11.2	22754322	23140114	386
32.	CG-120	M	Del	1q25.1q31.1	175629207	189971441	14342
33.	CG-124	V	Del	22q11.21	18938367	21462353	2252
34.	CG-126	V	Del	22q11.21	18967371	21462353	2495
35.	CG-132	M	Del	7q34q36.3	141245033	159119486	17874
36.	CG-008	M	Dup	15q21.2q26.3 15q26.3	52649116 100052234	99980473 102397836	47710 2346
37.	CG-078	M	Dup	3q26.2q29 8p23.3p23.2	168175261 176818	197845233 3276617	29670 3100
38.	CG-085	M	Del	4q32.3q35.2 5p15.33p15.2	167263766 38139	3276617 12392815	23617 12355

Eil. Nr.	Tiriamąjo IN	Lytis	KSP	Chromosomos sritis	Pokyčio pradžia*	Pokyčio pabaiga*	KSP dydis (kb)
39.	CG-106	M	Dup	7q11.21q36.3	64679561	159119486	94440
			Del	Xq25q28	128325352	154880326	25555

IN – identifikacinis numeris; Del – delecija; Dup – duplikacija; M – moteris; V – vyras; \* – pagal naudoto lusto savybes

**Sindrominių IŠY grupėje** 25/132 (18,94 proc.) tiriamiesiems, turintiems IŠY ir genetiniam sindromui būdingą fenotipą, buvo nustatyti 25/253 (9,88 proc.) patogeniniai KSP ir patvirtinti genetiniai sindromai:

- *DiGeorge* sindromas (5/25),
- *Williams-Beuren* sindromas (3/25),
- 15q11.2 mikrodelecijos sindromas (3/25),
- *Wolf-Hirschhorn* sindromas (3/25),
- *Cri du chat* sindromas (1/25),
- 1p36 mikrodelecijos sindromas (1/25),
- 18q delecijos sindromas (1/25),
- 2q37 monosomijos sindromas (1/25),
- 16q24.3 mikrodelecijos sindromas (1/25),
- *Xia-Gibbs* sindromas (1/25),
- *Phelan-Mcdermid* sindromas (1/25),
- 1q mikrodelecijos sindromas (1/25),
- 1q21.1 pasikartojančios mikroduplikacijos sindromas (1/25),
- 7q11.23 duplikacijos sindromas (1/25),
- *Burn-McKeown* sindromas (1/25).

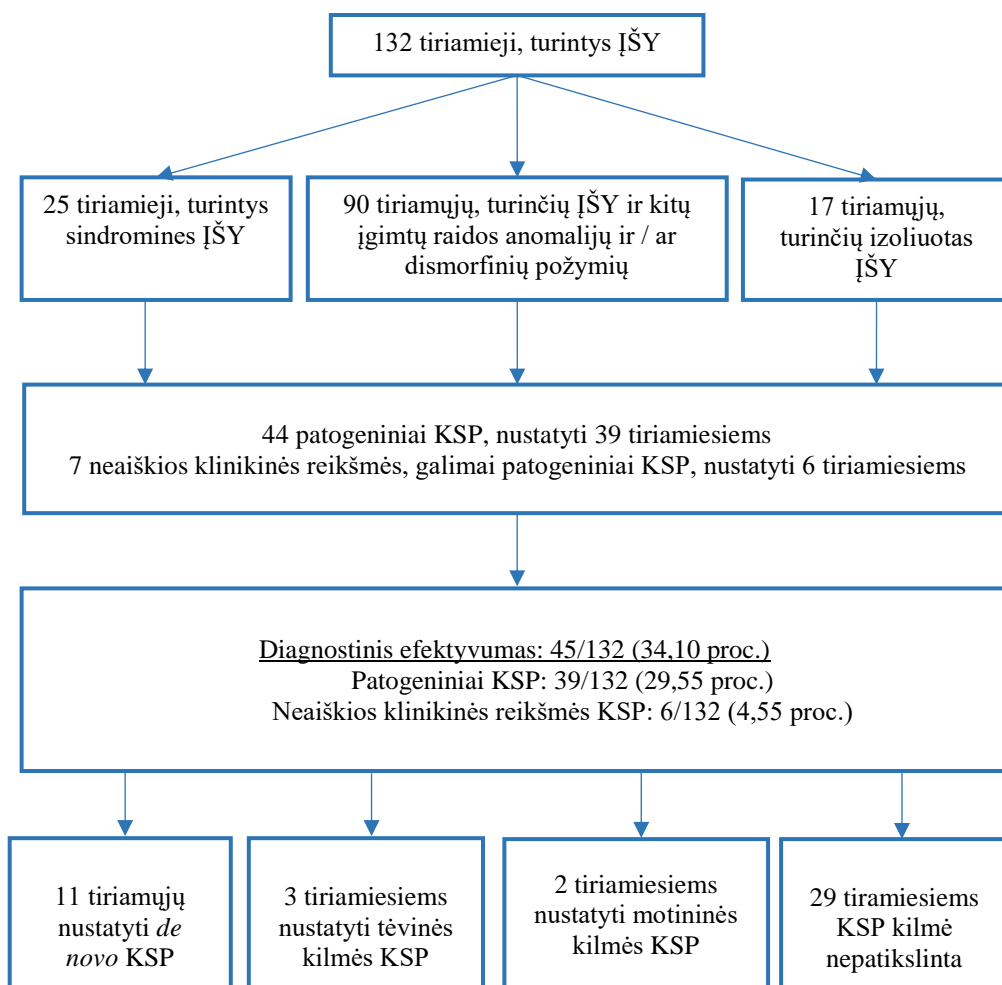
**IŠY ir kitų įgimtų raidos anomalijų ir / ar dismorfinių požymių grupės** 14/132 (10,61 proc.) tiriamųjų nustatyta 19/253 (7,5 proc.) patogeninių KSP (vienam tiriamajam nustatyti du patogeniniai KSP, keturi tiriamieji turėjo nesubalansuotas translokacijas, susidedančias iš delecijos ir duplikacijos). Patogeninius pokyčius sudarė 11/19 delecijų ir 8/19 duplikacijos. Delecijos apėmė 1q22q23.1, 1q25.1q31.1, 4q13.3, 4q32.3q35.2, 6q27, 7q34q36.3, 8p23.3p23.2, 10q22.3q23.33, 13q12.11 q12.12, 15q26.3 ir Xq25q28 genomines sritis. Duplikacijos apėmė 2q34, 3q26.2q29, 5p15.33p15.2, 7q11.21q36.3, 11p15.5, 14q12, 14q23.1 ir 15q21.2q26.3 genomines sritis.

Šioje grupėje 5/132 (3,79 proc.) tiriamiesiems nustatyti 6/253 (2,37 proc.) KSP, kurie klasifikuoti kaip neaiškios klinikinės reikšmės, galimai patogeniniai. Neaiškios klinikinės reikšmės KSP sudarė 15q11.1q11.2 duplikacijos (4/6), 10q21.3 delecija (1/6) ir 1p36.32p36.31 delecija (1/6).

**Izoliuotų IŠY grupėje** tiriamiesiems nebuvo nustatyta patogeninių KSP. Vienai tiriamajai (1/132, 0,76 proc.) nustatytas 1/253 (0,4 proc.) KSP (15q11.1q11.2 delecija), kuris buvo klasifikuotas kaip neaiškios klinikinės reikšmės KSP.

#### 4.3. Diagnostinis KSP nustatymo efektyvumas tiriamųjų grupėje

Tiriamųjų grupėje patogeninių KSP nustatymo dažnis sudarė 29,55 proc. ir neaiškios klinikinės reikšmės, galimai patogeninių KSP – 4,55 proc. Bendras diagnostinis KSP nustatymo efektyvumas tiriamųjų grupėje buvo 34,10 proc., kai pozityviais radiniais laikomi patogeniniai KSP ir neaiškios klinikinės reikšmės galimai patogeniniai KSP (4.5 paveikslas).



4.5 paveikslas. Diagnostinis patogeninių KSP nustatymo efektyvumas

Ekskliudavus genetinių sindromų, kuriuose nustatyti žinomi ĮŠY genai, atvejus, diagnostinis naujų patogeninių KSP nustatymo efektyvumas siekia 18,94 proc. (plačiau aptarta 4.8 skyriuje).

Tiriamųjų tėvams buvo atlikti nustatytų patogeninių KSP ir neaiškios klinikinės reikšmės, galimai patogeninių KSP kilmės (paveldėti iš vieno iš tėvų ar atsiradę *de novo*) nustatymo tyrimai. Iš viso 16-ai tiriamųjų buvo nustatyta patogeninių KSP ir neaiškios klinikinės reikšmės, galimai patogeninių KSP kilmė: 11 KSP buvo *de novo* kilmės, 2 KSP – motininės kilmės ir 3 KSP – tėvinės kilmės.

#### 4.4. KSP, siejamų su žinomais genetiniais sindromais ir ĮŠY, apibūdinimas

Tiriamųjų, turinčių ĮŠY ir žinomą genetinį sindromą, grupę sudarė 25/132 (18,94 proc.) tiriamieji, iš jų 10/25 (40,00 proc.) buvo vyriškos lyties ir 15/25 (60,00 proc.) moteriškos lyties asmenų.

Sindrominių ĮŠY grupės tiriamiesiems buvo diagnozuotos 32/189 ĮŠY. Vertinant pagal ĮŠY kompleksiskumą, 19/25 (76 proc.) tiriamųjų turėjo paprastas širdies ydas, 6/25 (24 proc.) tiriamiesiems buvo kompleksinė širdies yda. ĮŠY pasireiškimo dažnis tiriamųjų su sindrominėmis ĮŠY grupėje pateiktas 4.5 lentelėje.

Tarp 44/253 patogeninių KSP, nustatytų visoje tiriamųjų grupėje, 25/253 (9,88 proc.) patogeniniai KSP nustatyti tiriamiesiems su sindrominėmis ĮŠY. Iš jų 23/253 (9,1 proc.) patogeniniai KSP sutapo su mikrodelecijų sindromų genominėmis sritimis: *DiGeorge* sindromu (5/25), *Williams-Beuren* sindromu (3/25), 15q11.2 mikrodelecijos sindromu (3/25), *Wolf-Hirschhorn* sindromu (3/25), *Cri du chat* sindromu (1/25), 1p36 mikrodelecijos sindromu (1/25), 18q delecijos sindromu (1/25), 2q37 monosomijos sindromu (1/25), 16q24.3 mikrodelecijos sindromu (1/25), *Xia-Gibbs* sindromu (1/25), *Phelan-Mcdermid* sindromu (1/25), 1q mikrodelecijos sindromu (1/25), *Burn-McKeown* sindromu (1/25). Kiti 2/253 (0,78 proc.) patogeniniai KSP sutapo su mikroduplicacijų sindromų genominėmis sritimis: 1q21.1 pasikartojančios mikroduplicacijos sindromu (1/25), 7q11.23 duplicacijos sindromu (1/25).

4.5 lentelė. Kardiologinių fenotipų dažnių pasiskirstymas sindrominių ĮŠY grupėje

ĮŠY morfologinės grupės	Kardiologinių fenotipų pogrupiai	Dažnis	Santykinis dažnis, %
ĮŠY su normaliomis širdies segmentinėmis jungtimis	Pertvarų defektai	12	37,5
	Atrioventrikulinės pertvaros defektai	1	3,13
	Atrioventrikulinių vožtuvų anomalijos	4	12,50
	Arterijų vožtuvų anomalijos / išvaymo traktų obstrukcijos	6	18,75
	Tetrada Fallot	3	9,37
ĮŠY su nenormaliomis širdies segmentinėmis jungtimis	Funkcinė vieno skilvelio širdis	2	6,25
	Stambųjų kraujagyslių transpozicija	0	–
	Dvigubas ištekėjimas iš skilvelio	0	–
	Bendras arterinis kamienas	0	–
Stambųjų kraujagyslių anomalijos		4	12,50
Širdies padėties anomalijos		0	–
<b>Iš viso:</b>		<b>32</b>	<b>100</b>

Tarp 25 KSP, sutampančių su genetinių sindromų sritimis, 16 KSP apėmė sindromines ĮŠY lemiančius genus: *TBX1*, *CRKL* (*DiGeorge* sindromas), *ELN* (*Williams-Beuren* sindromas ir 7q11.23 duplikacijos sindromas), *EVC2* ir *EVC* (*Wolf-Hirschhorn* sindromas), *MEF2C* (*Cri du chat* sindromas), *NIPA1* ir *NIPA2* (15q11.2 mikrodelecijos sindromas) (4.6 lentelė). Kiti 9 sindrominiai KSP geno srityse neturėjo žinomų ĮŠY genų ir buvo atrinkti tolesnei ĮŠY genų kandidatų paieškos analizei.



4.6 lentelė. 16 KSP, lemiančių genetinius sindromus ir apimančių ĮŠY genus

KSP	Chromosomos sritis	KSP dydis (kb)	Genetinis sindromas	Įgimta širdies yda	ĮŠY žinomi genai / genai kandidatai
Del	22q11.21	2271	<i>DiGeorge</i>	TF	<b><i>TBX</i></b> , <b><i>CRKL</i></b> *
Del	5p15.33q13.3	30365	<i>Cri du chat</i>	PPD	<b><i>MEF2C</i></b>
Del	15q11.2	312	15q11.2 mikrodelecijos	TV atrezija, DS hipoplazija	<b><i>NIPAI</i></b> , <b><i>NIPA2</i></b>
Del	22q11.21	2108	<i>DiGeorge</i>	TF	<b><i>TBX</i></b> , <b><i>CRKL</i></b> *
Del	4p16.3p16.1	6438	<i>Wolf- Hirschhorn</i>	AoS, PPD	<b><i>EVC</i></b> , <b><i>EVC2</i></b>
Del	7q11.23	878	<i>Williams- Beuren</i>	Viršvožtuvinė AoS	<b><i>ELN</i></b>
Del	7q11.23	1415	<i>Williams- Beuren</i>	PAS	<b><i>ELN</i></b>
Del	22q11.21	2618	<i>DiGeorge</i>	TF	<b><i>TBX</i></b> , <b><i>CRKL</i></b> *
Del	15q11.2	326	15q11.2 mikrodelecijos	PPD	<b><i>NIPAI</i></b> , <b><i>NIPA2</i></b>
Dup	7q11.23	1364	7q11.23 duplikacijos	Ao vožtuvo nesandarumas, Ao aneurizma	<b><i>ELN</i></b>
Del	4p16.3p16.1	8643	<i>Wolf- Hirschhorn</i>	PPD	<b><i>EVC</i></b> , <b><i>EVC2</i></b>
Del	7q11.22q11.23	1415	<i>Williams- Beuren</i>	Ao vožtuvo nesandarumas	<b><i>ELN</i></b>
Del	4p16.3p15.2	21781	<i>Wolf- Hirschhorn</i>	PPD, PAVS	<b><i>EVC</i></b> , <b><i>EVC2</i></b>
Del	15q11.2	386	15q11.2 mikrodelecijos	MVN	<b><i>NIPAI</i></b> , <b><i>NIPA2</i></b>
Del	22q11.21	2252	<i>DiGeorge</i>	PPD, SPD	<b><i>TBX</i></b> , <b><i>CRKL</i></b> *
Del	22q11.21	2495	<i>DiGeorge</i>	PPD, SPD	<b><i>TBX</i></b> , <b><i>CRKL</i></b> *

Paryškintu šriftu pažymėti žinomi ĮŠY genai, \* - gyvūnų tyrimuose nustatyti genai.

Del – delecija; Dup – duplikacija; AAL – atviras arterinis latakas, Ao – aorta, AoS – aortos stenozė, DS – dešinysis skilvelis, MVN – mitralinio vožtuvo nesandarumas, PPD – prieširdžių pertvaros defektas, PAS – plaučių arterijos stenozė, PAVS – plaučių arterijos vožtuvo stenozė, SKT – stambiųjų kraujagyslių transpozicija, SPD – skilvelių pertvaros defektas, TF – tetradą Fallot, TV – triburis vožtuvas.

Šiame tyrime 5/25 tiriamiesiems (CG-007, CG-040, CG-093, CG-124 ir CG-126) buvo nustatytos 22q11.21 genomines srities delecijos, lemiančios *DiGeorge* (MIM# 188400) sindromą. Delecijų dydis varijavo nuo 2108 iki 2618 kb ir sutapo su kritine *DiGeorge* sindromo sritimi. Visais atvejais delecijos apėmė *TBX1* (MIM# 602054) geną, koduojantį Tdėžutės transkripcijos veiksnį. *TBX1* haplonepakankamumas lemia daugelį *DiGeorge* sindromo klinikinių požymių, taip pat širdies patologiją [Merscher *et al.*, 2001]. Pelių „*knockout*“ modelių tyrimai parodė, kad *Tbx1* reikalingas širdies progenitorinių ląstelių proliferacijai antriniame širdies lauke, nulemiančiame širdies ištekėjimo trakto vystymąsi [Xu *et al.*, 2004]. Kitas *DiGeorge* sindromo delecijos srityje esantis genas yra proteinkinazę koduojantis *CRKL* (MIM# 602007). Pelių modeliai parodė, kad deleciją *Crkl* gene turinčios pelės pasižymėjo anomaliu širdies ištekėjimo trakto vystymusi ir skilvelių pertvaros defektais [Guris *et al.*, 2001]. Širdies ydos, pasireiškiančios *DiGeorge* sindromo atveju, pasižymi dideliu penetrantiškumu ir apima kūginės skilvelių pertvaros dalies (angl. *conotruncal*) anomalijas – *truncus arteriosus*, TF ir pertrauktą aortos lanką. Trys tiriamieji, kuriems buvo nustatytas *DiGeorge* sindromas, turėjo TF, kiti du tiriamieji – prieširdžių ir skilvelių defektus.

*Williams-Beuren* (MIM# 194050) sindromas buvo nustatytas 3/25 tiriamiesiems: du tiriamieji (CG-062 ir CG-092) turėjo 7q11.12 genomines srities delecijas 878 kb ir 1415 kb dydžio atitinkamai, vienas tiriamasis (CG-116) – 1415 kb dydžio 7q11.22q11.23 deleciją. Visos delecijos apėmė struktūrinį baltymą elastiną koduojantį *ELN* (MIM3# 130160) geną. *Williams-Beuren* sindromo atveju dažniausiai nustatomos ĮŠY yra viršvožtuvinė aortos stenozė ir plaučių arterijos stenozė [del Pasqua *et al.*, 2009]. Tarp trijų pacientų, kuriems buvo *Williams-Beuren* sindromas, vienam pacientui nustatyta viršvožtuvinė aortos stenozė, kitam pacientui – plaučių arterijos stenozė, trečiam pacientui nustatyta mažiau būdinga *Williams-Beuren* sindromui širdies yda – aortos vožtuvo nesandarumas. *ELN* geno delecijos lemia viršvožtuvinę aortos stenozę [Metcalf *et al.*, 2000]. Pelių modeliai parodė, kad kito kritinėje sindromo srityje esančio geno *Baz1b* delecijos lemia spektrą netipinių šiam sindromui ydų – PPD, SPD, AoKo ir DIDS [Yoshimura *et al.*, 2009].

Vienam tiriamajam (CG-107) *Williams-Beuren* sindromo srityje nustatyta 1364 kb dydžio mikroduplikacija. Pacientui diagnozuota aortos aneurizma ir aortos vožtuvo nesandarumas. Literatūros duomenimis, 15 proc. pacientų su 7q11.23 duplikacijos sindromu pasireiškia AAL ir 46,2 proc. pacientų – aortos dilatacija [Morris *et al.*, 2015]. Yra žinoma, kad mikroduplikacijos lemia lengvesnius klinikinius fenotipus lyginant su mikrodelecijomis tose pačiose genomines srityse [Tzetis *et al.*, 2012].

Tiriamajam buvo nustatyta ĮŠY, kuri būdinga *Williams–Beuren* sindromą turintiems pacientams, tačiau kiti matomi klinikiniai požymiai buvo mažiau ryškūs.

*Wolf-Hirschhorn* (MIM# 194190) sindromas buvo diagnozuotas 3/25 tiriamiesiems. Vienam pacientui (CG-113), turinčiam PPD, buvo nustatyta 8643kb dydžio delecija 4p16.3p16.1 genomineje srityje. Kitam pacientui (CG-117), turinčiam PPD ir plaučių arterijos vožtuvo stenozę, nustatyta 21 781 kb dydžio 4p16.3p15.2 delecija. Trečiam pacientui (CG-051), turinčiam aortos stenozę ir PPD, buvo nustatyta 6438 kb dydžio 4p16.3p16.1 delecija. Sindromo klinikiniai požymiai varijuoja priklausomai nuo delecijos, apimančios 4p16.3 genomine sritį, dydžio [South *et al.*, 2008]. Visais trimis atvejais delecija apėmė *EVC* (MIM# 604831) ir *EVC2* (MIM# 607261) genus, koduojančius transmembraninius baltymus ir dalyvaujančius SHH signaliniame kelyje [Dorn *et al.*, 2012]. Kitas genas, patenkantis į 4p16.3 genomine sritį, yra *NSD2 (WHSC1)* (MIM# 602952). Pacientų, kuriems nustatytos 4p16.3 delecijos, genotipo-fenotipo palyginimas parodė, kad *NSD2* geno haplonepakankamumas lemia *Wolf-Hirschhorn* sindromo fenotipą [Maas *et al.*, 2008]. Tyrimai su *Whsc1<sup>-/-</sup>* mutantinėmis pelėmis, kurioms buvo prieširdžių ir pertvaros defektų, įrodė, kad *Whsc1* sąveikauja su širdies transkripcijos veiksmu NKX 2- 5 širdies pertvarų formavimosi metu [Nimura *et al.*, 2009]. Kitas ĮŠY genas kandidatas *Wolf-Hirschhorn* sindromo atveju yra *FGFRL1* (MIM# 605830). Šio geno delecijos *Fgfr1* pelėse lemia spektrą vystymosi defektų, iš jų ir ĮŠY – PPD ir psmėnulių bei atrioventrikulių vožtuvų deformacijas [Catela *et al.*, 2009].

15q11.2 mikrodelecijos sindromas (MIM# 615656) diagnozuotas 3/25 tiriamiesiems (CG-039, CG-099, CG-118), kuriems nustatytos 312 kb, 326 kb ir 386 kb dydžio delecijos, apimančios 15q11.2 BP1–BP2 sritį ir joje esančius 4 referentinės sekos baltymus koduojančius genus: *TUBGCP5* (MIM# 608147), *CYFIP1* (MIM# 606322), *NIPA2* (MIM# 608146) ir *NIPA1* (MIM# 608145). Tiriamųjų kardiologiniai fenotipai buvo triburio vožtuvo atrezija ir dešiniojo skilvelio hipoplazija, PPD ir MVN. 15q11.2 BP1–BP2 srities mikrodelecijos siejamos su vystymosi ir kalbos atsilikimu, elgesio sutrikimais, dismorfiniais požymiais [Butler, 2017]. Literatūros duomenimis, 9–17,3 proc. pacientų, kuriems nustatyta 15q11.2 delecija, turi ĮŠY [Cox and Butler, 2015; Vanlerberghe *et al.*, 2015]. 15q11.2 BP1–BP2 geno sritis pasižymi nevisiška penetrancija ir variabiliu fenotipu. Chai su kolegomis nustatė, kad šie keturi genai yra labai konservatyvūs ir pasižymi bialeline raiška. *CYFIP1*, *NIPA1* ir *NIPA2* raiška vyksta centrinėje nervų sistemoje [Chai *et al.*, 2003]. *TUBGCP5* genas siejamas su neurologinėmis ir elgesio

sutrikimo ligomis. Šio geno specifinė raiška vyksta pagumburyje [Nagase *et al.*, 2001].

Vienam tiriamajam (CG-019), turinčiam PPD, buvo nustatyta 30 365 kb dydžio delecija 5p15.33p13.3 genomineje srityje, lemianti *Cri du chat* sindromą. Delecija apima 5q14.3 genomine sritį, kurioje yra *MEF2C* genas (MIM# 600662), priklausantis MEF2 transkripcijos veiksnių šeimai. *MEF2C* genas dalyvauja širdies pirmtako ląstelių transkripcijos reguliacijoje ir kardiomiocitų diferenciacijoje ir yra siejamas su priekinio širdies lauko vystymusi embriogenezėje [Zweier *et al.*, 2010]. Naujausi tyrimai parodė, kad *MEF2C* geno funkcijos praradimo mutacijos lemia ĮŠY [Qiao *et al.*, 2017].

#### 4.4.1. KSP, apimančių ĮŠY žinomus genus / genus kandidatus, apibūdinimas

Keturiems (4/39) tiriamiesiems buvo nustatytos nesubalansuotos translokacijos, kurios apėmė žinomus ĮŠY genus, todėl į tolesnę ĮŠY genų kandidatų paieškos analizę šie KSP nebuvo įtraukti (4.7 lentelė). Tiriamajai (CG-008), turinčiai visišką atrioventrikulinę komunikaciją su dideliu pirminiu PPD ir bendru skilveliu, bendru atrioventrikulinio vožtuvo nesandarumu ir AAL, buvo nustatyta *de novo* nesubalansuota translokacija: 47 710 kb dydžio 15q21.2q26.3 srities duplikacija ir 2346 kb dydžio 15q26.3 srities delecija. Duplikacija apėmė su atrioventrikuline komunikacija siejamą *NR2F2* (MIM# 10773) geną [Al Turki *et al.*, 2014] ir su ĮŠY siejamą *SMAD6* (MIM# 602931) geną; delecijos srityje buvo nustatyti trys su ĮŠY siejami genai *MAP2K1/MEK* (MIM# 176872), *ALDH1A2* (MIM# 603687), *FBNI* (MIM # 134797).

Tėvinės kilmės nesubalansuota translokacija nustatyta tiriamajai (CG-078), turinčiai SPD. Nustatyta 3100 kb dydžio delecija 8p23.3p23.2 genomineje srityje ir 29 670 kb dydžio duplikacija 3q26.3q29 genomineje srityje, apimanti ĮŠY genus kandidatus *PRKCI* (MIM# 600539), *DVL3* (MIM# 601368) ir *ECE2* (MIM# 610145).

4.7 lentelė. Tiriamųjų, kuriems nustatyti žinomus ĮŠY genus apimantys KSP, apibūdinimas

Tiriamąjo IN	ĮŠY	KSP	Chromosomos sritis	KSP dydis (kb)	ĮŠY žinomi genai / genai kandidatai
CG-008	VAK, atrioventrikulinio vožtuvo nesandarumas, AAL	Dup	15q21.2q26.3	47710	<i>SMAD6</i> , <i>STRA6</i> , <i>NRG4</i> , <i>CHRNA3</i> , <i>MESP1</i> , <i>NR2F2</i> , <i>IGF1R</i> , <i>MEF2A</i>
		Del	15q26.3	2346	<i>MAP2K1</i> , <i>ALDH1A2</i> , <i>FBNI</i>
CG-078	SPD	Dup	3q26.2q29	29670	<i>PRKCI</i> , <i>DVL3</i> , <i>ECE2</i>
		Del	8p23.3p23.2	3100	-
CG-085	AAL, PPD	Del	4q32.3q35.2	23617	<i>HAND2</i> , <i>CASP3</i>
		Dup	5p15.33p15.2	12355	<i>TERT</i> , <i>IRX4</i> , <i>MTRR</i>
CG-106	PPD, SPD. Plati plaučių arterija. Hipoplastiški Ao lankas ir nusileidžianti Ao	Dup	7q11.21q36.3	94440	<i>ELN</i> , <i>FKBP6</i> , <i>SEMA3C</i> , <i>SEMA3D</i> , <i>SRI</i> , <i>KRIT1</i> , <i>CAVI</i> , <i>BRAF</i> , <i>NOS3</i> , <i>SMARCD3</i> , <i>SHH</i>
				Del	Xq25q28

Paryškintu šriftu pažymėti žinomi ĮŠY genai.

IN – identifikacinis numeris; Del – delecija; Dup – duplikacija; Ao – aorta, PPD – prieširdžių pertvaros defektas, SPD – skilvelių pertvaros defektas, VAK – visiška atrioventrikulinė komunikacija, AAL – atviras arterinis latakas

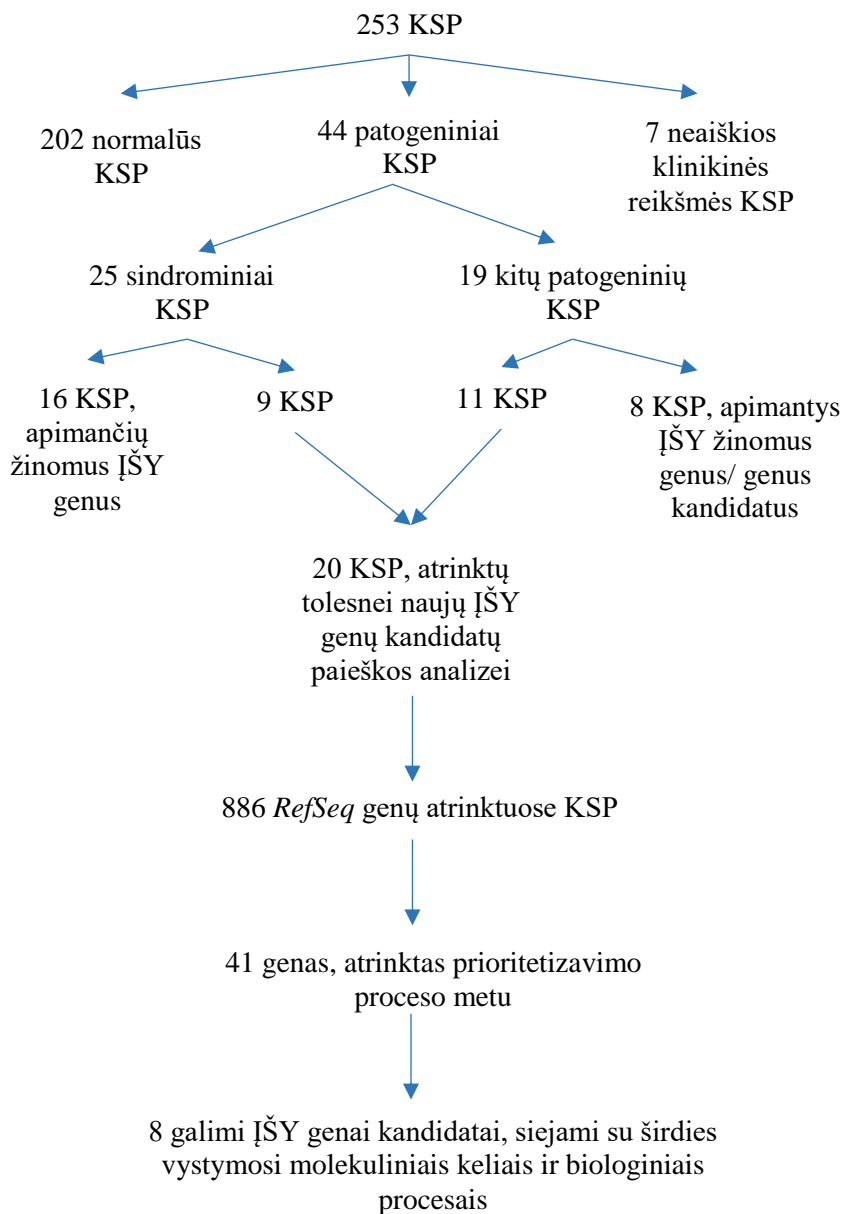
Tiriamajai (CG-085), kuriai diagnozuota PPD ir AAL, buvo nustatyta nesubalansuota translokacija: 23 617 kb dydžio 4q32.3q35.2 delecija apėmė su ĮŠY siejamą geną *HAND2* (MIM# 602407), ir 12 355 kb dydžio duplikacija, kurios srityje lokalizuoti ĮŠY genai kandidatai *TERT* (MIM# 187270) ir *IRX4* (MIM# 606199).

*De novo* nesubalansuota translokacija – 94 440 kb dydžio 7 chromosomos q11.21q36.3 genominės srities duplikacija ir 25 555 kb dydžio X chromosomos q25q28 genominės srities delecija, nustatyta tiriamajai (CG-106), turinčiai PPD, SPD, plaučių arterijos išsiplėtimą, hipoplastiškus aortos lanką ir nusileidžiančią aortą. Duplikacija apėmė ĮŠY lemiantį geną *ELN* (MIM# 130160), delecija – nesindromines ĮŠY lemiantį geną *ZIC3* (MIM# 300265), su širdies vožtuvų displazija siejamą geną *FLNA* (MIM# 300017) ir kitą su ĮŠY siejamą geną *GPC3* (MIM# 30037).

#### 4.5. Naujų ĮŠY genų kandidatų nustatymas ir apibūdinimas

Tolesnei analizei ir ĮŠY genų kandidatų paieškai buvo atrinkta 20/253 patogeninių KSP variantų, kuriuose pirminės analizės metu nenustatyti žinomi ĮŠY genai. Šie patogeniniai variantai nebuvo nustatyti šio tyrimo kontrolinėje grupėje (355 kontrolinės grupės asmenys, kuriems nustatyti 545 KSP) (aprašyta 3.1 skyriuje) ir nesutapo su *DGV* duomenų bazėje aprašytais polimorfinėmis KSP sritimis. KSP nustatymo ir naujų ĮŠY genų kandidatų paieškos schema pateikiama 4.6 paveiksle.

Tarp 44/253 patogeninių KSP, 16/44 KSP sutapo su žinomų sindromų genominėmis sekomis ir apėmė žinomus ĮŠY genus. 8/44 KSP priklausė nesubalansuotų translokacijų grupei ir apėmė žinomus ĮŠY genus (aprašyta 4.4.1 skyriuje). Todėl naujiems ĮŠY genams kandidatams nustatyti buvo atlikta genų, esančių 20 KSP, analizė (4.8 lentelė).



4.6 paveikslas. KSP nustatymo ir naujų ĮŠY genų kandidatų paieškos schema

4.8 lentelė. KSP, atrinkti ĮŠY genų kandidatų paieškos analizei

KSP	Chromosomos sritis	KSP dydis (kb)	Genetinis sindromas	Kilmė	Įgimta širdies yda
Del	10q22.3q23.33	14154	-	<i>de novo</i>	PPD
Dup	2q34	607	-	n/d	AAL, TV regurgitacija
Del	4q13.3	1560	-	motininė	Ao vožtuvo anomalija
Del	1p36.22p36.32	8366	1p36 mikrodelecijos	<i>de novo</i>	SPD, AAL, TV atrezija, DS hipoplazija
Del	18q22.1q23	12920	18q delecijos	<i>de novo</i>	PAVS
Del	2q37.1q37.3	8210	2q37 monosomijos	n/d	SPD
Del	16q24.3	352	16q24.3 mikrodelecijos	n/d	AVK
Del	1q22q23.1	1563	-	<i>de novo</i>	PPD, AAL
Dup	14q23.1	885	-	n/d	PPD, PAVS
Del	1p36.11p35.3	1142	<i>Xia-Gibbs</i>	n/d	PPD, PAS
Del	22q13.31q13.33	6819	<i>Phelan-Mcdermid</i>	n/d	SPD
Del	1q42.3q44	13375	1qter mikrodelecijos	n/d	SPD, PPD
Del	6q27	3500	-	<i>de novo</i>	AoS
Del	13q12.11q12.12	5363	-	<i>de novo</i>	MVN
Dup	1q21.1q21.2	1344	1q21.1 pasikartojančios mikroduplikacijos	motininė	SPD, AoKo
Dup	11p15.5	482	-	n/d	Ao vožtuvo nesandarumas
Dup	14q12	321	-	n/d	Ao vožtuvo nesandarumas
Del	18q23	1133	<i>Burn-McKeown</i>	n/d	MVN, aortos vožtuvo ir mitralinio vožtuvo ydos
Del	1q25.1q31.1	14342	-	n/d	SPD, PPD, AAL
Del	7q34q36.3	17874	-	n/d	SPD

Del-delecija; Dup-duplikacija; n/d-nėra duomenų.

AAL – atviras arterinis latakas, Ao – aorta, AoS – aortos stenozė, AVK – atrioventrikulinė komunikacija, DS – dešinysis skilvelis, MVN – mitralinio vožtuvo nesandarumas, PPD – prieširdžių pertvaros defektas, PAS – plaučių arterijos stenozė, PAVS – plaučių arterijos vožtuvo stenozė, SKT – stambųjų kraujagyslių transpozicija, SPD – skilvelių pertvaros defektas, TF – tetradą Fallot, TV – triburis vožtuvas.



#### 4.5.1. Genų, įtrauktų į patogeninius KSP, analizė

Molekulinių kelių ir tinklų analizei atlikti genai kandidatai, kuriuos apėmė delecijos ir duplikacijos, analizuoti atskirai. Sąrašą genų, kuriuos apėmė 15 delecijų, sudarė 840 genų, ir genų, kuriuos apėmė 5 duplikacijos, sudarė 46 genai.

Tyrimo metu 20/253 patogeninių KSP srityse esančių genų buvo palyginti su ĮŠY genais kandidatais, pateiktais publikuotuose ĮŠY genų kandidatų sąrašuose [Tomita-Mitchell *et al.*, 2012; Sanchez-Castro *et al.*, 2016]. Buvo atrinktas 41 ĮŠY genas kandidatas, kuris atsikartojo mažiausiai dviejuose bioinformaciniuose šaltiniuose (4.9 lentelė). Iš šių atrinktų genų 8 genai yra žinomi ĮŠY rizikos genai – *ANKRD1*, *GJA5*, *ACP6*, *BCL9*, *CHD1L*, *FMO5*, *PRKAB2* ir *HRAS*, jie į tolesnę ĮŠY genų kandidatų paieškos analizę nebuvo įtraukti.

4.9 lentelė. 41 ĮŠY genas kandidatas, atrinktas pagal publikuotus ĮŠY genų sąrašus

KSP	Chromosomos sritis	ĮŠY žinomi genai / genai kandidatai
Del	10q22.3q23.33	<i>BMPRIA*</i> , <i>PTEN*</i> , <i>ANKRD1*</i>
Dup	2q34	<i>ERBB4*</i>
Del	4q13.3	<i>ADAMTS3</i> <sup>▲</sup> , <i>ANKRD17</i> <sup>▲</sup>
Del	1p36.22p36.32	<i>MTHFR*</i> , <i>CLCN6*</i> , <i>NPPA*</i> , <i>NPPB*</i>
Del	18q22.1q23	<i>NFATC1*</i> , <i>KCNG2*</i>
Del	2q37.1q37.3	<i>TRPM8</i> , <i>PER2</i>
Del	16q24.3	-
Del	1q22q23.1	<i>LMNA*</i>
Dup	14q23.1	<i>MNAT1</i>
Del	1p36.11p35.3	<i>TRNAUIAP</i>
Del	22q13.31q13.33	<i>CELSRI</i> , <i>MAPK12</i>
Del	1q42.3q44	<i>MTR</i> , <i>CHRM3</i>
Del	6q27	<i>ERMARD</i> , <i>TCTE3</i>
Del	13q12.11q12.12	<i>IFT88*</i> , <i>FGF9*</i>
Dup	1q21.1q21.2	<i>GJA5</i> <sup>▲</sup> , <i>ACP6</i> <sup>▲</sup> , <i>BCL9</i> <sup>▲</sup> , <i>CHD1L</i> <sup>▲</sup> , <i>FMO5</i> <sup>▲</sup> , <i>PRKAB2</i> <sup>▲</sup>
Dup	11p15.5	<i>HRAS*</i> , <i>TALDO1*</i>
Dup	14q12	<i>PRKDI*</i>
Del	18q23	<i>NFATC1</i> , <i>TXNL4A</i>
Del	1q25.1q31.1	-
Del	7q34q36.3	<i>PRKAG2*</i> , <i>KCNH2*</i> , <i>NOS3*</i> , <i>SMARCD3*</i> , <i>SHH*</i>

Del – delecija; Dup – duplikacija; Paryškintu šriftu pažymėti žinomi ĮŠY genai; \* – genai, nustatyti *de novo* KSP; ▲ – genai, nustatyti motininės kilmės KSP; • – genai, nustatyti KSP, kurių kilmė nežinoma.

Kitas sąrašas esančių genų prioritizavimo etapas buvo atliktas naudojant *ToppGene* programą [Chen *et al.*, 2009]. Tyrimo metu nustatyta, kad šioje programoje buvo anotuota 18 genų, kurie susiję su GO biologiniais procesais: širdies ir kraujagyslių sistemos vystymusi – „GO:0072358 *Cardiovascular system development*“, kraujo apytakos sistemos vystymusi – „GO:0072359 *Circulatory system development*“, širdies vystymusi – „GO:0007507 *Heart development*“, širdies raumens audinio vystymusi – „GO:0048738 *Cardiac muscle tissue development*“, širdies raumens audinio ląstelių proliferacijos reguliavimu – „GO:0060043 *Regulation of cardiac muscle cell proliferation*“ ir širdies morfogeneze – „GO:0003007 *Heart morphogenesis*“ (4.10 lentelė).

Kitame etape, naudojant *Gene Expression Database (GXD) in Mouse Genome Informatics (MGI)* duomenų bazę (<http://www.informatics.jax.org/expression.shtml/>), buvo analizuoti pelių širdies embriogenezės genų raiškos modeliai. ĮŠY genų kandidatų sąrašas buvo toliau prioritizuojamas remiantis genų raiška endotelyje, širdyje ar vožtuvuose širdies embriogenezės metu. Nustatyta, kad 14 genų buvo anotuoti MGI duomenų bazėje ir asocijuoti su ĮŠY pelių raiškos modeliuose pagal MGI terminus: nenormali širdies skilvelio morfologija – „MP:0005294 *Abnormal heart ventricle morphology*“, nenormali širdies morfologija – „MP:0000266 *Abnormal heart morphology*“, nenormalus širdies vystymasis – „MP:0000267 *Abnormal heart development*“, nenormali kairiosios širdies morfologija – „MP:0003921 *Abnormal heart left ventricle morphology*“ ir nenormali perikardo morfologija – „MP:0000288 *Abnormal pericardium morphology*“ (4.10 lentelė).

4.10 lentelė. Genų, kuriuos apėmė reti KSP, statistiškai reikšmingi genų ontologiniai (GO) ir MGI terminai

Identifikacinis numeris	Apibūdinimas	Genai	Genų skaičius	Anotuoti genai	p reikšmė
<i>Molekulinė funkcija</i>					
<b>GO:0004672</b>	Proteinkinazės aktyvumas ( <i>Protein kinase activity</i> )	<i>FGF9, BMPRIA, ERBB4, PRKD1, MAPK12, PRKAG2, MNAT1, KCNH2</i>	8	649	7,956E-6
<b>GO:0016772</b>	Transferazės aktyvumas, pernešant fosforo turinčią grupę ( <i>Transferase activity, transferring phosphorus-containing groups</i> )	<i>FGF9, BMPRIA, ERBB4, PRKD1, MAPK12, PRKAG2, MNAT1, KCNH2</i>	8	1006	1,801E-4
<b>GO:0070851</b>	Augimo veiksnio receptoriaus surišimas ( <i>Growth factor receptor binding</i> )	<i>FGF9, ERBB4, PTEN</i>	3	143	1,692E-3
<i>Biologinis procesas</i>					
<b>GO:0072358</b>	Širdies ir kraujagyslių sistemos vystymasis ( <i>Cardiovascular system development</i> )	<i>ANKRD17, NPPA, FGF9, NPPB, BMPRIA, ERBB4, PRKD1, PTEN, LMNA, NFATC1, IFT88, MNAT1, SHH, SMARCD3, NOS3</i>	15	1058	2,393E-11
<b>GO:0072359</b>	Kraujo apytakos sistemos vystymasis ( <i>Circulatory system development</i> )	<i>ANKRD17, NPPA, FGF9, NPPB, BMPRIA, ERBB4, PRKD1, PTEN, LMNA, NFATC1, IFT88, MNAT1, SHH, SMARCD3, NOS3</i>	15	1058	2,393E-11
<b>GO:0007507</b>	Širdies vystymasis ( <i>Heart development</i> )	<i>NPPA, FGF9, BMPRIA, ERBB4, PTEN, LMNA, NFATC1, IFT88, MNAT1, SHH, SMARCD3</i>	11	593	1,477E-9
<b>GO:0048738</b>	Širdies raumens audinio vystymasis	<i>NPPA, FGF9, ERBB4, PTEN, LMNA, IFT88</i>	6	215	1,278E-6

Identifikacinis numeris	Apibūdinimas	Genai	Genų skaičius	Anotuoti genai	p reikšmė
	<i>(Cardiac muscle tissue development)</i>				
<b>GO:0060043</b>	Širdies raumens audinio ląstelių proliferacijos reguliavimas <i>(Regulation of cardiac muscle cell proliferation)</i>	<i>FGF9, ERBB4, PTEN</i>	3	34	2,413E-5
<b>GO:0003007</b>	Širdies morfogenezė <i>(Heart morphogenesis)</i>	<i>FGF9, BMPRIA, NFATC1, IFT88, SHH, SMARCD3</i>	6	252	2,116E-6
<b><i>Pelių fenotipai</i></b>					
<b>MP:0005294</b>	Nenormali širdies skilvelio morfologija <i>(Abnormal heart ventricle morphology)</i>	<i>ANKRD17, NPPA, FGF9, ERBB4, PRKD1, PTEN, LMNA, NFATC1, IFT88, NOS3</i>	10	745	1,479E-5
<b>MP:0000266</b>	Nenormali širdies morfologija <i>(Abnormal heart morphology)</i>	<i>ANKRD17, NPPA, FGF9, BMPRIA, ERBB4, PRKD1, PRKAG2, PTEN, LMNA, NFATC1, IFT88, KCNH2, SHH, NOS3</i>	14	1465	6,869E-6
<b>MP:0000267</b>	Nenormalus širdies vystymasis <i>(Abnormal heart development)</i>	<i>ANKRD17, FGF9, BMPRIA, ERBB4, PTEN, LMNA, NFATC1, IFT88, KCNH2, SHH</i>	10	388	4,036E-8
<b>MP:0003921</b>	Nenormali kairiosios širdies morfologija <i>(Abnormal heart left ventricle morphology)</i>	<i>NPPA, FGF9, ERBB4, PRKD1, PTEN, LMNA, NFATC1, NOS3</i>	8	343	2,492E-6
<b>MP:0000288</b>	Nenormali perikardo morfologija <i>(Abnormal pericardium morphology)</i>	<i>ANKRD17, BMPRIA, PTEN, NFATC1, IFT88, KCNH2, SHH</i>	7	259	4,586E-6

#### 4.5.2. Naujų ĮŠY genų kandidatų apibūdinimas

Prioritetizavimo proceso metu buvo nustatyti 8 nauji ĮŠY genai kandidatai – *FGF9*, *BMPRIA*, *PTEN*, *ANKRD17*, *NPPA*, *LMNA*, *NFATC1* ir *IFT88*. ĮŠY genai kandidatai buvo nustatyti patogeniniuose KSP, iš kurių penki genominiai pokyčiai buvo *de novo* kilmės ir vienas genominis pokytis – motininės kilmės. Šie genai dalyvauja svarbiuose embriono vystymosi procesuose – Akt, BMP ir Wnt signaliniuose keliuose bei remodeliuojant chromatiną.

Dvi *de novo* delecijos nustatytos 1-oje chromosomoje. *De novo* 8366 kb dydžio 1p36.22p36.32 delecija, apimanti ĮŠY geną kandidatą *NPPA* (MIM#108780), buvo nustatyta tiriamajai (CG-037), turinčiai DS hipoplaziją, SPD, TV atreziją ir AAL. Kita *de novo* intersticinė 1563 kb dydžio 1q22q23.1 delecija, kuri apėmė ĮŠY geną kandidatą *LMNA* (MIM#150330), buvo nustatyta pacientei (CG-067), turinčiai PPD ir AAL.

ĮŠY genas kandidatas *ANKRD17* (MIM#615929) lokalizuotas 4q13.3 genominiėje srityje. Pacientei (CG-018), turinčiai aortos vožtuvo anomaliją, nustatyta 1560 kb dydžio 4q13.3 delecija, ji paveldėta iš motinos, turinčios hipertrofinę kardiomiopatiją.

*De novo* 14 154 kb dydžio delecijoje, esančioje 10q22.3q23.33 genominiėje srityje, buvo nustatyti su ĮŠY siejami *BMPRIA* (MIM#601299) ir *PTEN* (MIM#601728) genai. Tiriamosios (CG-010) kardiologinis fenotipas – PPD.

*De novo* 5363 kb dydžio delecija 13q12.11q12.12 genominiėje srityje apėmė ĮŠY genus kandidatus *IFT88* (MIM#600595) ir *FGF9* (MIM#176943). Delecija nustatyta tiriamajam (CG-090), turinčiam MVN.

ĮŠY genas kandidatas *NFATC1* (MIM#600489) buvo nustatytas 18q23 genominiėje srityje. Dviem pacientėms, turinčioms širdies vožtuvų formavimosi ydas, buvo nustatytos delecijos 18 chromosomos ilgajame petyje. Pacientei (CG-044), turinčiai plaučių arterijos vožtuvo stenozę, nustatyta *de novo* 12 920 kb dydžio 18q22.1q23 delecija. Kitai pacientei (CG-112), turinčiai MVN ir aortos formavimosi defektus, nustatyta 1133 kb dydžio 18q23 delecija, jos kilmė nebuvo nustatyta.

## 4.6. KSP palyginimas tiriamojoje ir kontrolinėje grupėse

### 4.6.1. KSP dažnių palyginimas tiriamojoje ir kontrolinėje grupėse

Remiantis šio tyrimo pirminiais rezultatais ir rezultatais, pateiktais publikuotuose panašaus pobūdžio tyrimuose [Kaminsky *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2017], buvo iškelta hipotezė, kad reti geniniai KSP gali būti reikšmingi ĮŠY reikštis. Siekiant įvertinti retų KSP pasiskirstymo dažnį tiriamojoje ir kontrolinėje grupėse, KSP buvo kategorizuoti pagal chromosominio pokyčio tipą – delecijas ir duplikacijas – ir suskirstyti į penkias kategorijas: geniniai KSP, dažni KSP, dažni geniniai KSP, reti KSP ir reti geniniai KSP. Reti KSP buvo apibūdinti tie, kurie nustatomi <1 proc. dažniu ir minimaliai (<30 proc.) sutapo arba nesutapo su *DGV* duomenų bazėje pateiktais KSP. Geniniais KSP buvo laikomi tie KSP, kurie apėmė *RefSeq* genų sekas. Dažni KSP buvo tie, kurie >70 proc. sutapo su bent vienu *DGV* duomenų bazėje pateiktu KSP. Buvo palygintas 132 tiriamųjų grupės, kurioje nustatyti 253 KSP, ir 355 asmenų kontrolinės grupės, kurioje nustatyti 545 KSP, KSP dažnis.

4.11 lentelė. ĮŠY turinčių tiriamųjų ir kontrolinės grupės KSP dažnis

KSP kategorija	Tiriamosios grupės 253 KSP	Kontrolinės grupės 545 KSP	Santykis	p reikšmė
	KSP (%)	KSP (%)		
<b>Reti geniniai</b>	64 (25,30)	52 (9,54)	<b>2,65</b>	<0,0001
<b>Reti</b>	69 (27,27)	70 (12,84)	<b>2,12</b>	<0,0001
<b>Dažni geniniai</b>	133 (52,57)	274 (50,28)	<b>1,05</b>	0,0086
<b>Dažni</b>	184 (72,73)	475 (87,16)	<b>0,83</b>	0,0003
<b>Geniniai</b>	197 (77,87)	326 (59,82)	<b>1,30</b>	<0,0001

Paryškintu šriftu pažymėti reikšmingi skirtumai KSP kategorijose

Vertinant tiriamosios ir kontrolinės grupių visų geninių KSP pasiskirstymo dažnį (4.11 lentelė), geniniai KSP buvo 1,3 karto dažnesni ĮŠY turintiems tiriamiesiems (77,87 proc. tiriamojoje grupėje ir 59,82 proc. kontrolinėje grupėje), ir šis skirtumas buvo statistiškai reikšmingas ( $p < 0,0001$ ). Dažni geniniai KSP taip pat buvo reikšmingai dažnesni ĮŠY turinčių tiriamųjų grupėje ( $p = 0,0086$ ). Reti geniniai KSP dažniau (2,65 karto) pasireiškė ĮŠY turinčių tiriamųjų grupėje (25,30 proc. tiriamųjų grupėje, 9,54 proc. kontrolinėje grupėje), ir šis skirtumas buvo statistiškai reikšmingas ( $p < 0,0001$ ).

Atlikus lyginamąją analizę dažnų KSP pasiskirstymo tarp tiriamosios ir kontrolinės grupių, nustatyta, kad dažnų KSP dažnis buvo statistiškai reikšmingai didesnis kontrolinėje grupėje ( $p = 0,0003$ ). Dažni geniniai KSP reikšmingai nesiskyrė tarp grupių. Tačiau visi reti KSP pasireiškė 2,12 karto dažniau tiriamųjų grupėje (27,27 proc. tiriamųjų grupėje, 12,84 proc. – kontrolinėje grupėje), ir šis tiriamosios ir kontrolinės grupės skirtumas buvo reikšmingas ( $p < 0,0001$ ).

4.12 lentelė. ĮŠY turinčių tiriamųjų ir kontrolinės grupės delecijų dažnis

Delecijos	Tiriamosios grupės 253 KSP	Kontrolinės grupės 545 KSP	Santykis	p reikšmė
	KSP (%)	KSP (%)		
<b>Retos geninės</b>	36 (43,37)	27 (10,80)	<b>4,02</b>	<0,0001
<b>Retos</b>	39 (46,99)	36 (14,40)	<b>3,26</b>	<0,0001
<b>Dažnos geninės</b>	29 (34,94)	112 (44,80)	0,78	0,1961
<b>Dažnos</b>	44 (53,01)	214 (85,60)	0,62	0,3845
<b>Geninės</b>	65 (78,31)	139 (55,60)	<b>1,41</b>	<0,0001

Paryškintu šriftu pažymėti delecijų pasiskirstymo reikšmingi skirtumai

Analizuojant retų KSP dažnį delecijų grupėje, nustatyta, kad retos delecijos statistiškai reikšmingai dažnesnės (3,26 karto) ĮŠY turinčių tiriamųjų grupėje (46,99 proc. tiriamojame grupėje ir 14,40 proc. kontrolinėje grupėje) ( $p < 0,0001$ ). O, vertinant dažnų delecijų pasireikimą ĮŠY turinčių tiriamųjų ir kontrolinėje grupėse, dažnų delecijų buvo daugiau kontrolinėje grupėje, tačiau šis skirtumas nebuvo reikšmingas. Reikšmingas nustatytas tiriamosios ir kontrolinės grupės visų geninių delecijų pasiskirstymo skirtumas ( $p < 0,0001$ ) – šios delecijos buvo 1,41 karto dažnesnės tiriamojame grupėje (78,31 proc. tiriamojame grupėje ir 55,60 proc. kontrolinėje grupėje). Vertinant dažnų geninių delecijų dažnį, nebuvo nustatyta reikšmingo skirtumo tarp grupių ( $p = 0,1961$ ). Tačiau retos geninės delecijos 4,02 karto reikšmingai dažniau ( $p < 0,0001$ ) pasireiškė tiriamojame grupėje (43,37 proc. tiriamojame grupėje ir 10,80 proc. kontrolinėje grupėje) (4.12 lentelė).

Lyginant duplikacijų pasiskirstymo dažnį, reikšmingas skirtumas nustatytas retų duplikacijų kategorijoje – retos duplikacijos buvo 1,53 karto dažnesnės tiriamųjų grupėje, palyginti su kontroline grupe ( $p = 0,0076$ ) (4.13 lentelė). Dažnų duplikacijų dažnis statistiškai reikšmingai buvo didesnis kontrolinėje grupėje ( $p = 0,0015$ ), tačiau dažnos geninės duplikacijos buvo reikšmingai 1,11 karto dažnesnės tiriamųjų grupėje (61,18 proc. tiriamojame

grupėje, 54,2 proc. – kontrolinėje grupėje). Vertinant visų geninių duplikacijų pasiskirstymą tiriamojoje ir kontrolinėje grupėse, geninės duplikacijos buvo 1,22 karto dažnesnės ĮŠY turintiems tiriamiesiems (77,65 proc. tiriamojoje grupėje, ir 63,39 proc. kontrolinėje grupėje) ir šis skirtumas buvo statistiškai reikšmingas ( $p = 0,0001$ ). Retos geninės duplikacijos taip pat reikšmingai dažniau (1,94 karto) pasireiškė tiriamojoje grupėje (16,47 proc. tiriamojoje grupėje ir 8,47 proc. kontrolinėje grupėje) ( $p = 0,0037$ ). Dažnų geninių duplikacijų dažnis statistiškai reikšmingai skyrėsi tiriamųjų ir kontrolinėje grupėse ( $p = 0,0205$ ) (4.13 lentelė).

4.13 lentelė. ĮŠY turinčių tiriamųjų ir kontrolinės grupės duplikacijų dažnis

Duplikacijos	Tiriamosios	Kontrolinės	Santykis	p reikšmė
	grupės 253 KSP	grupės 545 KSP		
	KSP (%)	KSP (%)		
<b>Retos geninės</b>	28 (16,47)	25 (8,47)	<b>1,94</b>	0,0037
<b>Retos</b>	30 (17,65)	34 (11,53)	<b>1,53</b>	0,0076
<b>Dažnos geninės</b>	104 (61,18)	162 (54,92)	<b>1,11</b>	0,0205
<b>Dažnos</b>	140 (82,35)	261 (88,47)	<b>0,93</b>	0,0015
<b>Geninės</b>	132 (77,65)	187 (63,39)	<b>1,22</b>	0,0001

Paryškintu šriftu pažymėti duplikacijų pasiskirstymo reikšmingi skirtumai

#### 4.6.2. KSP dažnių palyginimas grupėse, suskirstytose pagal KSP dydį ( $\leq 500$ kb ir $\geq 501$ kb)

Siekiant įvertinti KSP pasiskirstymo dažnį tiriamojoje ir kontrolinėje grupėse, KSP buvo kategorizuoti pagal chromosominio pokyčio tipą – delecijos ir duplikacijos – ir suskirstyti į penkias kategorijas: geniniai KSP, dažni KSP, dažni geniniai KSP, reti KSP ir reti geniniai KSP. Remiantis literatūroje pateiktais įrodymais apie didelių KSP susidarymo mechanizmus [Redon *et al.*, 2006], šio tyrimo KSP papildomai buvo suskirstyti į dvi grupes pagal KSP dydį:  $\leq 500$  kb ir  $\geq 501$  kb.

Vertinant  $\leq 500$  kb dydžio visų KSP pasiskirstymą tiriamojoje ir kontrolinėje grupėse, statistiškai reikšmingų skirtumų nustatyta geninių ir dažnų geninių KSP kategorijose – geniniai KSP pasireiškė 1,27 karto dažniau (75,15 proc. tiriamųjų grupėje, 59,35 proc. – kontrolinėje grupėje) ( $p = 0,0002$ ), o dažni geniniai KSP buvo 1,25 karto dažnesni ĮŠY turinčių tiriamųjų grupėje, palyginti su kontroline grupe (62,13 proc. tiriamųjų grupėje,



49,59 proc. – kontrolinėje grupėje) ( $p = 0,0049$ ). Retų geninių KSP grupėje taip pat nustatytas 1,33 karto didesnis KSP dažnis, tačiau skirtumas nebuvo reikšmingas ( $p = 0,2473$ ) (4.14 lentelė).

4.14 lentelė. KSP, suskirstytų pagal dydį, dažnis tiriamųjų ir kontrolinėje grupėse

KSP dydis	KSP kategorija	Santykiniai dažniai (%)		Santykis	p reikšmė
		Tiriamoji grupė	Kontrolinė grupė		
≤500 kb	Reti geniniai	13,02	9,76	1,33	0,2473
	Reti	14,20	12,80	1,11	0,6925
	Dažni geniniai	62,13	49,59	<b>1,25</b>	0,0049
	Dažni	85,80	87,20	0,98	0,6432
	Geniniai	75,15	59,35	<b>1,27</b>	0,0002
≥501 kb	Reti geniniai	50,00	7,55	<b>6,63</b>	<0,0001
	Reti	53,57	13,21	<b>4,06</b>	<0,0001
	Dažni geniniai	33,33	56,60	<b>0,59</b>	0,0073
	Dažni	46,43	86,79	<b>0,53</b>	<0,0001
	Geniniai	83,33	64,15	<b>1,30</b>	0,0106

Paryškintu šriftu pažymėti KSP pasiskirstymo reikšmingi skirtumai

Panašus dažnių skirtumas nustatytas ≤500 kb dydžio geninių delecijų kategorijoje – geninės delecijos reikšmingai 1,29 karto dažniau pasireiškė ĮŠY turinčių tiriamųjų grupėje (70,00 proc. tiriamųjų grupėje, 54,47 proc. – kontrolinėje grupėje) ( $p = 0,0439$ ). Reikšmingo dažnių skirtumo nenustatyta lyginant dažnų ir dažnų geninių delecijų reiškimąsi tiriamojoje ir kontrolinėje grupėse ( $p = 0,7202$  ir  $p = 0,1169$  atitinkamai). Retos ir retos geninės ≤500 kb dydžio delecijos buvo nereikšmingai dažnesnės ĮŠY turinčių tiriamųjų grupėje lyginant su kontroline grupe ( $p=0,7202$  ir  $p=0,4942$  atitinkamai) (4.15. lentelė).

4.15 lentelė. Delecijų, suskirstytų pagal dydį, dažnis tiriamųjų ir kontrolinėje grupėse

KSP dydis	Delecijos	Santykiniai dažniai (%)		Santykis	p reikšmė
		Tiriamoji grupė	Kontrolinė grupė		
≤500 kb	Retos geninės	14,00	10,64	1,32	0,4942
	Retos	16,00	14,04	1,14	0,7202
	Dažnos geninės	56,00	43,83	1,28	0,1169
	Dažnos	84,00	85,96	0,98	0,7202
	Geninės	70,00	54,47	<b>1,29</b>	0,0439
≥501 kb	Retos geninės	87,88	13,33	<b>6,59</b>	<0,0001
	Retos	93,94	20,00	<b>4,70</b>	<0,0001
	Dažnos geninės	3,03	60,00	<b>0,05</b>	<0,0001
	Dažnos	6,06	80,00	<b>0,08</b>	<0,0001
	Geninės	90,91	73,33	1,24	0,1830

Paryškintu šriftu pažymėti delecijų pasiskirstymo reikšmingi skirtumai

Dublikacijų, kurių dydis yra ≤500 kb, kategorijoje retų geninių duplikacijų pasiskirstymo dažnis buvo 1,41 karto didesnis tiriamojame grupėje, tačiau šis skirtumas buvo nereikšmingas ( $p = 0,2740$ ) (4.16 lentelė). Lyginant tiriamąją ir kontrolinę grupes pagal retų ≤500 kb dydžio duplikacijų raišką, reikšmingo skirtumo nenustatyta ( $p = 0,6257$ ). Dažnų geninių duplikacijų buvo 1,18 karto dažniau tiriamojame grupėje, tačiau statistškai nereikšmingai ( $p = 0,0721$ ). Lyginant dažnų ≤500 kb dydžio duplikacijų pasireiškimą, šios duplikacijos buvo nereikšmingai dažnesnės kontrolinėje grupėje ( $p = 0,6257$ ). Geninės duplikacijos reikšmingai dažniau pasireiškė kontrolinėje grupėje nei tiriamojame grupėje ( $p < 0,0001$ ) (4.16 lentelė).

Toliau pateikiama KSP pasiskirstymo tarp tiriamosios ir kontrolinės grupės lyginamoji analizė didelių genominių pokyčių, t. y. ≥501 kb dydžio KSP kategorijoje. Nustatyta, kad ≥501 kb dydžio geniniai KSP buvo 1,3 karto dažnesni tiriamiesiems (83,33 proc. tiriamųjų grupėje, 64,15 proc. kontrolinėje grupėje) ir šis skirtumas buvo statistškai reikšmingas ( $p = 0,0106$ ) (4.14 lentelė).

4.16 lentelė. Duplikacijų, suskirstytų pagal dydį, dažnis tiriamųjų ir kontrolinėje grupėse

KSP dydis	Duplikacijos	Santykiniai dažniai (%)		Santykis	p reikšmė
		Tiriamoji grupė	Kontrolinė grupė		
≤500 kb	Retos geninės	12,61	8,95	1,41	0,2740
	Retos	13,45	11,67	1,15	0,6257
	Dažnos geninės	64,71	54,86	1,18	0,0721
	Dažnos	86,55	88,33	0,98	0,6257
	Geninės	77,31	97,28	<b>0,79</b>	<0,0001
≥501 kb	Retos geninės	25,49	5,26	<b>4,84</b>	0,0117
	Retos	27,45	10,53	<b>2,61</b>	0,0493
	Dažnos geninės	52,94	55,26	0,96	0,8279
	Dažnos	72,55	89,47	<b>0,81</b>	0,0492
	Geninės	78,43	60,52	<b>1,30</b>	0,0020

Paryškintu šriftu pažymėti duplikacijų pasiskirstymo reikšmingi skirtumai

Reti ≥501 kb dydžio KSP reikšmingai skyrėsi tiriamosios ir kontrolinės grupių – reti KSP buvo 4,06 karto dažnesni tiriamųjų grupėje (53,57 proc. tiriamųjų grupėje, 13,21 proc. – kontrolinėje grupėje) ( $p < 0,0001$ ). Šis skirtumas buvo dar didesnis retų ≥501 kb dydžio delecijų kategorijoje – retos delecijos buvo reikšmingai 4,7 karto dažnesnės ( $p < 0,0001$ ) tiriamųjų grupėje (93,94 proc. tiriamųjų grupėje, 20,00 proc. – kontrolinėje grupėje) (4.15. lentelė). O retos ≥501 kb dydžio duplikacijos buvo 2,61 karto dažnesnės tiriamųjų grupėje (27,45 proc. tiriamųjų grupėje, 10,53 proc. – kontrolinėje grupėje), ir šis skirtumas buvo reikšmingas ( $p = 0,0493$ ) (4.16 lentelė).

Tyrimo rezultatai parodė, kad didžiausias reikšmingas skirtumas tarp tiriamosios ir kontrolinės grupių, vertinant ≥501 kb dydžio KSP, buvo nustatytas retų geninių KSP kategorijoje – reti geniniai KSP buvo 6,63 karto reikšmingai dažnesni ( $p < 0,0001$ ) IŠY turintiems tiriamiesiems (50,00 proc. tiriamųjų grupėje, 7,55 proc. – kontrolinėje grupėje) (4.14 lentelė). Akivaizdu, kad šį reikšmingą skirtumą ( $p < 0,0001$ ) nulėmė didelis dažnis retų geninių delecijų, kurios 6,59 kartus buvo dažnesnės tiriamųjų grupėje (87,88 proc. kontrolinėje grupėje, 13,33 proc. – tiriamojoje grupėje) (4.15 lentelė). Retos geninės duplikacijos taip pat buvo reikšmingai 4,84 karto dažnesnės ( $p = 0,0117$ ) tiriamųjų grupėje, palyginti su kontrole (4.16 lentelė).

#### 4.7. KSP savybių palyginimas tiriamojoje ir kontrolinėje grupėse ir funkcinė įtaka

##### 4.7.1. KSP dydžio palyginimas tiriamojoje ir kontrolinėje grupėse

Buvo palygintos KSP savybės tiriamojoje ir kontrolinėje grupėse (4.17 lentelė). Tiriamųjų grupėje, kurią sudarė 132 tiriamieji, nustatyti 253 KSP. Vienam tiriamosios grupės tiriamajam tenkantis KSP skaičius sudarė 1,92 KSP. Tiriamojoje grupėje nustatytų KSP dydis varijavo nuo 21 kb iki 94 440 kb, vidutinis KSP dydis –  $2019 \pm 7794,43$  kb, KSP dydžio mediana – 286 kb.

Kontrolinėje grupėje, kurią sudarė 355 tiriamieji, nustatyti 545 KSP. Vienam kontrolinės grupės tiriamajam tenkantis KSP skaičius sudarė 1,54 KSP. KSP dydis varijavo nuo 28 kb iki 3941 kb, vidutinis KSP dydis –  $240 \pm 364,75$  kb, KSP dydžio mediana – 140 kb.

Palyginus tiriamosios ir kontrolinės grupių KSP dydžio medianą, didesnė KSP dydžio mediana nustatyta tiriamojoje grupėje, ir šis skirtumas buvo statistiškai reikšmingas ( $p < 0,0001$ ).

4.17 lentelė. Tiriamosios ir kontrolinės grupės KSP savybių palyginimas

<b>KSP savybės</b>	<b>Tiriamosios grupės 253 KSP</b>	<b>Kontrolinės grupės 545 KSP</b>
Vidutinis KSP skaičius asmeniui	1,92	1,54
Vidutinis VNP skaičius, tenkantis vienam KSP	210	56
Vidutinis KSP dydis (kb)	2019	240
KSP dydžio mediana (kb)	286	141
KSP dydžio ribos	21 – 94440	28 – 3941
$\leq 500$ kb dydžio KSP dalis	0,67	0,90
Didelių ( $\geq 501$ kb) KSP dalis	0,33	0,10

Siekiant palyginti ir apibūdinti tiriamosios ir kontrolinės grupės KSP savybes, KSP buvo kategorizuoti pagal chromosominio pokyčio tipą – delecijas ir duplikacijas. Tiriamojoje grupėje tarp 253 KSP buvo nustatytos 84 delecijos (33,20 proc.) ir 169 duplikacijos (66,80 proc.) (4.18 lentelė). Delecijų dydis varijavo nuo 21 kb iki 30 365 kb, vidutinis delecijos dydis –  $3080 \pm 6310,63$  kb, dydžio mediana – 319 kb. Duplikacijų dydis varijavo nuo

46 iki 94 440 kb, vidutinis duplikacijos dydis –  $1492 \pm 8394,98$  kb, dydžio mediana – 283 kb (4.18 lentelė).

4.18 lentelė. Tiriamosios ir kontrolinės grupės delecijų ir duplikacijų savybių palyginimas

<b>KSP tipas</b>	<b>Tiriamosios grupės 253 KSP</b>	<b>Kontrolinės grupės 545 KSP</b>
<b>Delecijos</b>		
Bendras skaičius	84	250
Visų KSP dalis	0,33	0,46
Vidutinis dydis (kb)	3080	166
Dydžio mediana (kb)	319	123
Dydžio ribos	21 – 30365	28 – 1335
<b>Duplikacijos</b>		
Bendras skaičius	169	295
Visų KSP dalis	0,67	0,54
Vidutinis dydis (kb)	1492	304
Dydžio mediana (kb)	283	151
Dydžio ribos	46 – 94440	41 – 3941

Kontrolinėje grupėje delecijos sudarė 45,87 proc. (250 delecijų), duplikacijos – 54,13 proc. (295 duplikacijos) visų KSP. Delecijos dydis varijavo nuo 28 kb iki 1335 kb, vidutinis delecijos dydis –  $166 \pm 178,26$  kb, dydžio mediana – 123 kb. Duplikacijų dydis varijavo nuo 41 kb iki 3941 kb, vidutinis duplikacijos dydis –  $304 \pm 458,78$  kb, dydžio mediana – 151 kb (4.18 lentelė).

4.19 lentelė. Tiriamosios ir kontrolinės grupės delecijų ir duplikacijų dydžio medianų palyginimas

<b>KSP tipas</b>	<b>Grupė</b>	<b>Dydžio mediana (kb)</b>	<b>Tiriamųjų grupė, palyginti su kontroline grupe</b>	
			<b>Santykis</b>	<b>p reikšmė</b>
<b>Delecijos</b>	Tiriamoji	319	<b>2,59</b>	<0,0001
	Kontrolinė	123		
<b>Duplikacijos</b>	Tiriamoji	283	<b>1,87</b>	<0,0001
	Kontrolinė	151		

Paryškintu šriftu pažymėti dydžio medianų reikšmingi skirtumai

Palyginus tiriamosios ir kontrolinės grupių delecijų dydžio medianą, buvo nustatyta 2,59 karto didesnė mediana tiriamojoje grupėje, ir šis skirtumas buvo statistiškai reikšmingas ( $p < 0,0001$ ). Duplikacijų dydžio

medianos taip pat reikšmingai skyrėsi tiriamosios ir kontrolinės grupių – tiriamojoje grupėje nustatyta 1,87 didesnė mediana ( $p < 0,0001$ ) (4.19 lentelė).

#### 4.7.2. Genų, kuriuos apima KSP, skaičiaus palyginimas tiriamojoje ir kontrolinėje grupėse

Išanalizavus geninius KSP, buvo nustatytas reikšmingas tiriamosios ir kontrolinės grupių genų, kuriuos apima KSP, skaičiaus vidutinės reikšmės skirtumas (4.20 lentelė). Tiriamųjų grupėje KSP genų skaičiaus vidutinė reikšmė buvo reikšmingai 3,41 karto didesnė ( $9,38 \pm 18,71$  – tiriamojoje grupėje ir  $2,75 \pm 2,76$  – kontrolinėje grupėje) visų KSP kategorijoje ( $p < 0,0001$ ). Dažni KSP apėmė 1,75 karto reikšmingai daugiau genų tiriamojoje grupėje, palyginti su kontroline grupe ( $4,64 \pm 5,98$  – tiriamojoje grupėje ir  $2,65 \pm 2,68$  – kontrolinėje grupėje) ( $p = 0,0071$ ). Retų KSP kategorijoje genų, kuriuos apėmė KSP, skaičiaus vidutinė reikšmė buvo dar didesnė ir siekė 6,96 karto daugiau tiriamojoje grupėje, palyginti su kontroline ( $23,05 \pm 31,95$  – tiriamojoje grupėje ir  $3,31 \pm 3,12$  – kontrolinėje grupėje). Šis statistinis skirtumas tarp tiriamosios ir kontrolinės grupės buvo reikšmingas ( $p < 0,0001$ ).

4.20 lentelė. Tiriamosios ir kontrolinės grupių genų, kuriuos apėmė KSP, skaičiaus vidutinės reikšmės palyginimas

KSP kategorija	Tiriamoji grupė	Kontrolinė grupė	Tiriamųjų grupė, palyginti su kontroline grupe	
	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	Santykis	p reikšmė
<b>Reti</b>	$23,05 \pm 31,95$	$3,31 \pm 3,12$	<b>6,96</b>	$<0,0001$
<b>Dažni</b>	$4,64 \pm 5,98$	$2,65 \pm 2,68$	<b>1,75</b>	$0,0071$
<b>Visi</b>	$9,38 \pm 18,71$	$2,75 \pm 2,76$	<b>3,41</b>	$<0,0001$

$\bar{x} \pm s$  – vidutinė reikšmė  $\pm$  standartinis nuokrypis. Paryškintu šriftu pažymėti vidutinės reikšmės reikšmingi skirtumai.

Išanalizavus genų, kuriuos apėmė KSP, skaičiaus vidutinės reikšmės skirtumus duplikacijų grupėje, nustatyta, kad dažnos duplikacijos apėmė 2,27 karto reikšmingai daugiau genų ( $5,54 \pm 6,41$  – tiriamojoje grupėje ir  $2,44 \pm 2,65$  – kontrolinėje grupėje) ( $p < 0,001$ ), o retos duplikacijos – reikšmingai 3 kartus ( $p = 0,0020$ ) daugiau genų ( $8,27 \pm 7,83$  – tiriamojoje grupėje ir  $2,76 \pm 3,65$  – kontrolinėje grupėje) (4.21 lentelė). Delecijų grupėje tiriamosios ir kontrolinės grupių genų skaičiaus vidutinės reikšmės skirtumas buvo dar didesnis. Visų delecijų genų skaičiaus vidutinė reikšmė buvo 5,8

karto didesnė ( $18,11 \pm 32,56$  – tiriamojoje grupėje ir  $3,12 \pm 2,67$  – kontrolinėje grupėje), palyginti su kontroline grupe, ir šis skirtumas buvo reikšmingas ( $p = 0,0035$ ). Retų delecijų genų skaičiaus vidutinė reikšmė buvo 10,31 karto reikšmingai didesnė ( $39,30 \pm 40,05$  – tiriamojoje grupėje ir  $3,81 \pm 2,48$  – kontrolinėje grupėje), palyginti su kontroline grupe ( $p = 0,0010$ ). Vidutinė reikšmė skaičiaus genų, kuriuos apėmė dažnos delecijos, reikšmingai skyrėsi tiriamosios ir kontrolinės grupių ( $p < 0,0001$ ) (4.21 lentelė).

4.21 lentelė. Tiriamosios ir kontrolinės grupių genų, kuriuos apėmė delecijos/duplikacijos, skaičiaus vidutinės reikšmės palyginimas

KSP tipas	KSP kategorija	Tiriamoji grupė	Kontrolinė grupė	Tiriamųjų grupė, palyginti su kontroline grupe	
		$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	Santykis	p reikšmė
Delecijos	Retos	$39,30 \pm 40,05$	$3,81 \pm 2,48$	<b>10,31</b>	0,001
	Dažnos	$1,16 \pm 0,55$	$2,96 \pm 2,70$	<b>0,39</b>	<0,0001
	Visos	$18,11 \pm 32,56$	$3,12 \pm 2,67$	<b>5,80</b>	0,0035
Duplikacijos	Retos	$8,27 \pm 7,83$	$2,76 \pm 3,65$	<b>3,00</b>	0,002
	Dažnos	$5,54 \pm 6,41$	$2,44 \pm 2,65$	<b>2,27</b>	<0,0001
	Visos	$6,05 \pm 6,74$	$2,48 \pm 2,79$	<b>2,44</b>	<0,0001

$\bar{x} \pm s$  – vidutinė reikšmė  $\pm$  standartinis nuokrypis. Paryškintu šriftu pažymėti vidutinės reikšmės reikšmingi skirtumai

#### 4.7.3. Genų, kuriuos apėmė reti KSP, haplonepakankamumo įverčio palyginimas tiriamojoje ir kontrolinėje grupėse

Tyrimo rezultatai parodė, kad genai, kuriuos apėmė reti KSP, buvo siejami su mažesniu genų haplonepakankamumo įverčiu (HI), rodančiu geno jautrumą dozės efektui [Huang *et al.*, 2010]. Lyginant tiriamosios ir kontrolinės grupių visų KSP genų vidutinę reikšmę, nustatyta, kad tiriamojoje grupėje KSP apėmė 1,94 karto reikšmingai daugiau HI genų ( $p < 0,0001$ ) (4.22 lentelė). Reti KSP apėmė 2,45 karto daugiau HI genų ĮŠY turinčių tiriamųjų grupėje, palyginti su kontroline grupe, ir šis skirtumas buvo statistiškai reikšmingas ( $p = 0,0187$ ). Dažnų KSP kategorijoje nebuvo

nustatyta tiriamosios ir kontrolinės grupių reikšmingo skirtumo tarp KSP genų skaičiaus vidutinės reikšmės ( $p = 0,6010$ ) (4.22 lentelė).

4.22 lentelė. Tiriamosios ir kontrolinės grupių HI genų, kuriuos apėmė KSP, skaičiaus vidutinės reikšmės palyginimas

KSP kategorija	Tiriamoji grupė	Kontrolinė grupė	Tiriamųjų grupė, palyginti su kontroline grupe	
	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	Santykis	p reikšmė
<b>Reti</b>	2,45 ± 2,52	1,00 ± 0,00	<b>2,45</b>	0,0187
<b>Dažni</b>	1,00 ± 0,00	1,04 ± 0,20	0,96	0,6010
<b>Visi</b>	2,00 ± 2,19	1,03 ± 0,18	<b>1,94</b>	<0,0001

$\bar{x} \pm s$  – vidutinė reikšmė ± standartinis nuokrypis. Paryškintu šriftu pažymėti vidutinės reikšmės reikšmingi skirtumai

Delecijų atveju vidutinis HI genų skaičius buvo reikšmingai 3,08 karto didesnis tiriamųjų grupėje, palyginti su kontroline grupe ( $p = 0,002$ ). O duplikacijų atveju buvo nustatytas tiriamosios ir kontrolinės grupių nežymus 1,15 karto vidutinis HI genų skaičiaus skirtumas, tačiau statistškai nereikšmingas ( $p = 0,7180$ ) (4.23 lentelė). Vidutinis HI genų skaičius nesiskyrė tiriamosios ir kontrolinės grupių pagal dažnų delecijų ir dažnų duplikacijų kategorijas.

4.23 lentelė. Tiriamosios ir kontrolinės grupių HI genų, kuriuos apėmė delecijos / duplikacijos, skaičiaus vidutinės reikšmės palyginimas

KSP tipas	Tiriamoji grupė	Kontrolinė grupė	Tiriamųjų grupė, palyginti su kontroline grupe	
	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	Santykis	p reikšmė
<b>Delecijos</b>	3,08 ± 3,03	1,00 ± 0,00	<b>3,08</b>	0,0020
<b>Dublikacijos</b>	1,24 ± 0,75	1,08 ± 0,28	1,15	0,7180

$\bar{x} \pm s$  – vidutinė reikšmė ± standartinis nuokrypis. Paryškintu šriftu pažymėti vidutinės reikšmės reikšmingi skirtumai

Retos duplikacijos, kurios sudarė 56,25 proc. (9/16) visų HI genus apimančių duplikacijų tiriamojoje grupėje, apėmė 1,4 karto daugiau HI genų, palyginti su kontroline grupe, tačiau šis skirtumas buvo nereikšmingas. Retos delecijos, sudarančios 84,62 proc. (11/13) visų HI genus apimančių delecijų tiriamojoje grupėje, apėmė 3,5 karto daugiau HI genų, palyginti su kontroline grupe, tačiau dėl mažos imties negalima atsakyti, ar šis skirtumas buvo reikšmingas (4.24 lentelė).



4.24 lentelė. Tiriamosios ir kontrolinės grupių KSP, apimančių HI genus, dažnio palyginimas

KSP tipas	KSP kategorija	Tiriamoji grupė		Kontrolinė grupė	
		Dažnis	Santykinis dažnis (%)	Dažnis	Santykinis dažnis (%)
Delecijos	Retos	11	84,62	1	5,88
	Dažnos	2	15,38	16	94,12
	<b>Visos</b>	<b>13</b>	<b>100</b>	<b>17</b>	<b>100</b>
Duplikacijos	Retos	9	56,25	3	23,08
	Dažnos	7	43,75	10	76,92
	<b>Visos</b>	<b>16</b>	<b>100</b>	<b>13</b>	<b>100</b>

#### 4.8. Rezultatų aptarimas

Dauguma ĮŠY atvejų yra neaiškios etiologijos, todėl svarbiausias šio tyrimo tikslas buvo nustatyti naujus kliniškai reikšmingus genomo variantus ĮŠY turinčių tiriamųjų populiacijoje. Šiuolaikiniai plataus masto tyrimai parodė, kad KSP yra ne tik žmogaus genetinio variabilumo šaltinis, bet ir šie genomo variantai yra svarbūs daugiaveiksnėms ligoms, iš jų ir širdies ydoms, pasireikšti.

Šiame darbe buvo tirti 132 tiriamieji, turintys ĮŠY. Tiriamųjų grupės širdies ydoms būdinga heterogeniška ligos raiška: 12,88 proc. ĮŠY buvo izoliuotos, 18,94 proc. – sindrominės ir 68,18 proc., be ĮŠY, buvo kitų įgimtų raidos anomalijų ir / ar dismorfinių požymių. Tiriamųjų grupės ĮŠY apėmė keturias kardiologinių fenotipų grupes, iš kurių didžiausią grupę (71,43 proc.) sudarė ĮŠY su normaliomis širdies segmentinėmis jungtimis. Pagal kompleksiskumą ĮŠY suskirstytos į dvi grupes – anatomiškai atskiras ĮŠY (49,21 proc.) ir kompleksines ĮŠY (50,79 proc.). Tokia įvairi ĮŠY raiška rodo būdingą širdies ydoms didelį fenotipinį heterogeniškumą ir kompleksiskumą. Palyginus tiriamųjų dažnio pasiskirstymą pagal lytį visose minėtose grupėse, vyrų ir moterų dažnis visose grupėse statistiškai reikšmingai nesiskyrė ( $p = 0,690$ ). Įvertinus kardiologinių fenotipų dažnių pasiskirstymą tarp nustatytų ĮŠY tiriamojoje grupėje, dažniausios ĮŠY buvo pertvarų defektai, jie sudarė 48,89 proc. visų ĮŠY atvejų. Tai sutampa su literatūroje aprašytais įgimtų širdies ydų dažniais populiacijose [Wang *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2012]. Literatūros duomenimis, lyginant ĮŠY pasireiškimą tarp lyčių, visų tipų ĮŠY dažnesnės moterims (4,55 ĮŠY 1000 moterų ir 3,61 ĮŠY 1000 vyrų;  $p < 0,0001$ ) [Marelli *et al.*, 2007]. Šiame tyrime vertinant ĮŠY pasireiškimo priklausomybę nuo lyties, reikšmingos priklausomybės nebuvo nustatyta ( $p > \alpha$ ,  $\alpha = 0,05$ ). Statistiškai reikšminga nustatyta tik stambųjų kraujagyslių

anomalijų ir lyties priklausomybė ( $p = 0,029$ ,  $p > \alpha$ ,  $\alpha = 0,05$ ). Moterys pasižymėjo didesniu stambiųjų kraujagyslių anomalijų skaičiumi. Remiantis epidemiologinių tyrimų duomenimis, tam tikri ĮŠY tipai pasižymi skirtingu pasireiškimo dažniu tarp lyčių. Nustatyta, kad aortos koarktacija ir stambiųjų kraujagyslių transpozicija, priskirtos stambiųjų kraujagyslių anomalijoms, dažniau būna vyrams nei moterims [Samánek, 1994; Digilio *et al.*, 2001b]. Šio tyrimo tiriamųjų grupėje moterims 2,6 karto dažniau buvo nustatytos stambiųjų kraujagyslių anomalijos nei vyrams. Tokį skirtumą nulėmė atrinktos tiriamųjų grupės ĮŠY struktūra.

Naudojant plataus masto VNP-LGH genotipavimą, tiriamųjų grupėje 39 (29,55 proc.) ĮŠY turintiems tiriamiesiems buvo nustatyti 44 patogeniniai KSP, jie sudarė 17,39 proc. visų nustatytų KSP; 6 (4,55 proc.) tiriamiesiems buvo nustatyti neaiškios klinikinės reikšmės, galimai patogeniniai KSP. Šio tyrimo diagnostinis efektyvumas buvo 34,1 proc. ir yra didesnis, palyginti su kitais literatūroje aprašytais tyrimais. Literatūros duomenimis, patogeniniai ir / ar galimai patogeniniai KSP nustatomi 10–20 proc. visų ĮŠY atvejų [Carey *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2016]. Patogeniniai KSP dažniausiai nustatomi pacientams, kuriems yra kliniškai atpažįstami sindromai, tokie kaip *DiGeorge* sindromas ar *Williams-Beuren* sindromas, ir pacientams, turintiems dauginių vystymosi anomalijų ir dismorfinių požymių. Tačiau netgi izoliuotų ĮŠY atvejais nustatoma reikšmingai daugiau patogeninių KSP, palyginti su sveikų asmenų populiacija. Dauguma nustatytų patogeninių KSP sudarė delecijos (77,27 proc.). Šie tyrimo rezultatai sutampa su kitų autorių publikuotais tyrimų rezultatais ir patvirtina, kad delecijos yra labiau siejamos su klinikiniais fenotipais. Delecijų srityse esantys genai, kurie dalyvauja širdies embriogenezės procesuose, dėl pakitusios raiškos lemia ĮŠY atsiradimą.

Šio darbo tiriamųjų grupės sindrominių ĮŠY grupėje buvo nustatyti 25 patogeniniai KSP, iš kurių 16 patogeninių KSP turėjo aiškia patogeniškumo priežastį, nes apėmė žinomus ĮŠY genus: *TBX1*, *CRKL*, *ELN*, *EVC2*, *EVC*, *MEF2C*, *NIP1* ir *NIP2*. Literatūros duomenimis, KSP lemia 17–18 proc. sindrominių ĮŠY atvejų [Thienpont *et al.*, 2007; Breckpot *et al.*, 2010; Geng *et al.*, 2014]. Tačiau kai kurių tyrimų duomenimis, sindrominių ĮŠY grupėje patogeninių KSP diagnostinis efektyvumas buvo 25 proc. ir netgi 52,7 proc. [Richards *et al.*, 2008; Szymou *et al.*, 2013]. Šiame tyrime visiems tiriamiesiems, turintiems sindromines ĮŠY, buvo nustatytas bent vienas patogeninis pokytis. Tokį didelį diagnostinį efektyvumą lėmė tiriamųjų, turinčių kliniškai atpažįstamų genetinių sindromų, įtraukimas į tyrimą. Dažniausias genominis variantas, nustatomas ĮŠY turintiems pacientams, yra 22q11.2 delecija (*DiGeorge* sindromas), pasitaikanti 0,5–1,9 proc. visų ĮŠY atvejų. Šiame tyrime penkiems pacientams buvo nustatytos 22q11.21 geno

srities delecijos, visada apimančios *TBX1* geną. Tai sudarė 3,79 proc. visų tiriamosios grupės ĮŠY atvejų.

ĮŠY ir kitų įgimtų raidos anomalijų ir / ar dismorfinių požymių grupėje 14-ai tiriamųjų buvo nustatyta 19 patogeninių KSP, iš kurių 8 KSP apėmė žinomus širdies ydų genus: *SMAD6*, *MAP2K1/MEK1*, *FBN1*, *HAND2*, *IRX4*, *ELN*, *FLNA* ir *ZIC3*. Patogeninių KSP nustatymo diagnostinis efektyvumas šioje grupėje buvo 10,61 proc. ir sutapo su literatūroje nurodytais kitų tyrimų duomenimis. Literatūros duomenimis, KSP lemia 3–28 proc. ĮŠY su kitomis įgimtomis raidos anomalijos atvejų [Lalani *et al.*, 2013; Syrmou *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2017].

Izoliuotų ĮŠY grupėje, sudarančioje 12,88 proc. visos tiriamųjų grupės, nebuvo nustatyta patogeninių KSP. Pacientei, turinčiai aortos vožtuvo nesandarumą ir raumeninį SPD, nustatyta neaiškios klinikinės reikšmės, galimai patogeninė 15q11.1q11.2 delecija, kuri neapėmė ĮŠY genų kandidatų *NIPAI* ir *NIPA2*. Galimai patogeniniai KSP dažniau nustatomi tiriamiesiems, turintiems izoliuotas ĮŠY, palyginti su tiriamaisiais, neturinčiais ĮŠY [Kim *et al.*, 2016]. Lyginant KSP diagnostinį efektyvumą izoliuotų ĮŠY grupėje su sindrominių ĮŠY ir ĮŠY su kitomis įgimtomis raidos anomalijomis grupėse, KSP diagnostinis efektyvumas yra mažesnis ir siekia 3–4,3 proc. [Erdogan *et al.*, 2008; Breckpot *et al.*, 2011; Soemedi *et al.*, 2012; Geng *et al.*, 2014]. Erdogan su kolegomis nustatė, kad 3 proc. *de novo* patogeninių KSP variantų susiję su izoliuotomis ĮŠY [Erdogan *et al.*, 2008]. Kiti tyrimai taip pat parodė, kad priežastinių KSP dažnis nesindrominių ĮŠY grupėje yra mažesnis, palyginti su sindrominių ĮŠY grupe – atitinkamai 3,6 proc. ir 19 proc. [Breckpot *et al.*, 2011]. Geng su kolegomis izoliuotų ĮŠY grupėje nustatė 4,3 proc. patogeninių KSP [Geng *et al.*, 2014]. Kiti tyrimai parodė, kad 4 proc. retų delecijų siejamos su sporadinių ĮŠY rizika [Soemedi *et al.*, 2012]. Izoliuotų kairiosios širdies pusės ydų tyrime kliniškai reikšmingi *de novo* KSP buvo nustatyti 1,8 proc. tiriamųjų [Hanchard *et al.*, 2017]. Tačiau kituose tyrimuose tiriamiesiems su izoliuotomis ĮŠY nebuvo nustatyta patogeninių KSP pokyčių, nors autoriai neatmeta tikimybės, kad tiriamųjų genome gali būti labai maži KSP [Richards *et al.*, 2008].

Didelis diagnostinis efektyvumas bendroje ĮŠY grupėje ir atskirose ĮŠY grupėse įrodo, kad LGH genotipavimas yra pirmiausia pasirenkamas genetinis diagnostinis metodas ĮŠY turinčių pacientų genetiniam ištyrimui. Šis metodas yra rekomenduojamas ĮŠY turinčių naujagimių ankstyvam genetiniam ištyrimui [Bachman *et al.*, 2015] ir vaikų, turinčių ĮŠY, o ypač ĮŠY kartu su kitomis įgimtomis raidos anomalijomis ir / ar dismorfiniais požymiais, ištyrimui [Wu *et al.*, 2017]. Šiame darbe nustatytas patogeninių KSP diagnostinis efektyvumas patvirtina kitų tyrimų rezultatus.

KSP nustatymas ĮŠY turintiems tiriamiesiems suteikia unikalų šaltinį ĮŠY genams kandidatams nustatyti. Patogeniniai KSP, siejami su ĮŠY, yra įvairiose genomo vietose ir apima šimtus genų, todėl svarbu nustatyti specifinius genus ir signalinius kelius, siejamus su skirtingomis ĮŠY. Tai savo ruožtu leis vystyti terapines strategijas ir pagerinti ĮŠY rizikos įvertinimą.

Eksliudavus patogeninius KSP, apimančius žinomus ĮŠY genus, buvo nustatyta 20 unikalių retų patogeninių KSP, atrinktų funkinei analizei. Visi šie KSP kartu apėmė 41-ą geną, siejamą su širdies vystymosi molekuliniais keliais ir biologiniais procesais. Panaudojus genų prioritetizavimo būdus, buvo nustatyti 8 ĮŠY genai kandidatai *FGF9*, *BMPRIA*, *PTEN*, *ANKRD17*, *NPPA*, *LMNA*, *NFATC1* ir *IFT88*, kuriuos apėmė penkios *de novo* kilmės ir viena motininės kilmės delecijos. Šie genai buvo susiję su GO biologiniais procesais, anotuoti *MGI* duomenų bazėje ir asocijuoti su ĮŠY pelių modeliais pagal *MGI* terminus.

Šio tyrimo metu buvo nustatyta *de novo* 14 154 kb dydžio 10q22.3q23.33 delecija, apimanti ĮŠY genus kandidatus *BMPRIA* ir *PTEN*. Didelės 10q22q23 delecijos yra siejamos su ĮŠY pasireiškimu. Literatūroje aprašyti didelės 10q delecijas turintys pacientai su būdingais kardiologiniais fenotipais – AVK, PPD, SPD ir triburio vožtuvo regurgitacija [Alliman *et al.*, 2010; Breckpot *et al.*, 2011; van Bon *et al.*, 2011]. *BMPRIA* koduoja kaulų morfogeninį 1A tipo receptorių ir dalyvauja BMP signaliniame kelyje. BMP signalinis kelias reguliuoja ląstelių proliferaciją, migraciją, diferenciaciją ir apoptozę. Pelių modeliuose *bmpr1a* geno delecija pažeidžia pelių širdies morfogenezę ir pasireiškia tarpkilvelinės pertvaros ir endokardo sustorėjimų (angl. *endocardial cushions*) defektais [Gaussin *et al.*, 2002]. Distaliau *BMPRIA* geno lokalizuotas *PTEN* yra svarbus auglio supresoriaus genas. Hamada su kolegomis parodė, kad *PTEN*, kuris reguliuoja kraujagyslių signalinių molekulių (angl. *vascular signaling molecules*) raišką, yra būtinas normaliai širdies ir kraujagyslių morfogenezei ir postnatalinei angiogenezei [Hamada *et al.*, 2005].

Kitą ĮŠY geną kandidatą *NFATC1* apėmė *de novo* 18q23 srities delecijos, nustatytos dviem pacientėms, turinčioms širdies vožtuvų formavimosi ydas. *NFATC1* baltymas priklauso Rel/NF-κB transkripcijos veiksnių šeimai, kurios nariai reguliuoja daugelio ląstelių proliferaciją, diferenciaciją ir homeostazę [Crabtree *et al.*, 2002]. *NFATC1* yra svarbus širdies vožtuvų formavimuisi. *NFATC1* raiška vyksta endokardo endotelio ląstelėse pirminiame širdies vamzdyje, o ankstyvose endokardo sustorėjimų (angl. *endocardial cushions*) formavimosi stadijose šio geno raiška specifiskai pasireiškia atrioventrikulinio kanalo ir ištekėjimo trakto endotelio ląstelėse [de la Pompa *et al.*, 1998]. *NFATC1* geno sutrikusi raiška lemia pelių

antrioventrikulinių ir pusrūnūlinių vožtuvų anomalijas [de la Pompa *et al.*, 1998; Ranger *et al.*, 1998]. Abdul-Sater su kolegomis parodė, kad *NFATC1* geno mutacijos lemia triburio vožtuvo atreziją [Abdul-Sater *et al.*, 2012].

Kitas ĮŠY genas kandidatas *ANKRD17* lokalizuotas 4q13.3 genominėje srityje. *ANKRD17* koduoja baltymą, turintį dvi ankirino pasikartojimų sankaupas. Pelių modelių tyrimai parodė, kad *Ankrd17* geno mutacijos pelių embrionuose lemia širdies ir kraujagyslių defektus [Hou *et al.*, 2009]. Pacientei, turinčiai aortos vožtuvo anomaliją, nustatyta 4q13.3 delecija buvo paveldėta iš motinos, turinčios hipertrofinę kardiomiopatiją.

*De novo* 13q12.11q12.12 delecija genominėje srityje apėmė ĮŠY genus kandidatus *IFT88* ir *FGF9*. Abu genai pelių modeliuose siejami su sutrikusia širdies morfogeneze. *FGF9* baltymas priklauso fibroblastų augimo veiksnų šeimai. *FGF* baltymai veikia kaip parakrininiai arba endokrininiai signalai širdies vystymosi metu. Nustatyta, kad *FGF9* raiška vyksta pelių širdies ląstelėse embriono vystymosi metu. Kardiomiocitų proliferacija „knockout“ pelių modelių *FGF9* pelėse buvo reikšmingai susilpnėjusi. Tai parodė, kad *FGF9* yra embrioninių kardiomiocitų augimo veiksnys [Itoh *et al.*, 2016]. *IFT88* genas dalyvauja formuojantis pirminėms blakstienėlėms ir yra susijęs su *hedgehog* signalinio kelio reguliacija ir ankstyva kardiogeneze. Buvo parodyta, kad *Ift88-null* pelių E11.5 embrionams, kurie neformavo blakstienėlių, sutriko ištekėjimo trakto vystymasis. Tai įrodo, kad širdies pirminės blakstienėlės, dalyvaudamos koordinuojant *hedgehog* signalinį kelią, vaidina svarbų vaidmenį ankstyvoje širdies embriogenezėje [Clement *et al.*, 2009].

*De novo* 1p36.22p36.32 delecija apėmė ĮŠY geną kandidatą *NPPA*. *NPPA* yra evoliuciškai konservatyvus genas, koduojantis A tipo natriuretinį baltymą (APN). Embriono vystymosi metu *NPPA* geno raiška intensyviai vyksta prieširdžių ir skilvelių miokarde [Houweling *et al.*, 2005]. Nustatyta, kad *NPPA* kartu su genu paralogu *NPPB* dėl artimos vienas kito atžvilgiu lokalizacijos genome formuoja evoliuciškai konservatyvią genų sankaupą, kuri sąveikauja su širdies vystymuisi funkciškai svarbiais NKX2-5, GATA, TBX5 ir kitais transkripcijos veiksniais [Houweling *et al.*, 2005; Man *et al.*, 2018]. Šių transkripcijos reguliacijos mechanizmų pažeidimai lemia ĮŠY [Bruneau, 2011].

Dozei jautrūs genai gali būti siejami su ĮŠY atsiradimu tiriamiesiems. Delecijos ligos fenotipą dažniausiai lemia dėl dozei jautraus geno haplonepakankamumo, o duplikacijos gali lemti ligą dėl geno triplojautrumo, geno sekos nutraukimo ar geno susijungimo per trūkio taškus. Kita *de novo* intersticinė 1q22q23.1 delecija apėmė ĮŠY geną kandidatą *LMNA*. Pacientei nustatyta 1q22q23.1 mikrodelecija yra mažiausia iki šiol aprašyta delecija,

apimanti *LMNA* geną [Aleksiūnienė *et al.*, 2018]. *LMNA* genas koduoja laminus A ir C, kurie susidaro dėl transkriptų alternatyvaus sukirpimo [Depreux *et al.*, 2015]. Laminai A ir C, esantys vidinėje branduolio membranoje, sąveikauja su branduolio apvalkalo baltymais, chromatinu ir transkripcijos veiksniais [Gupta *et al.*, 2010]. *LMNA* geno funkcijos praradimo mutacijos ir delecijos lemia geno haplonepakankamumą ir yra siejamos su dilatacine kardiomiopatija [Zaragoza *et al.*, 2016]. Šio tyrimo tiriamoji (CG-067) ir Quinonez su kolegomis aprašyti sibsi, turintys 1q21.3q23.3 deleciją, turėjo identišką kardiologinį fenotipą – PPD, AAL – ir galūnių kontraktūras [Quinonez *et al.*, 2012]. Tai leidžia manyti, kad struktūriniai širdies defektai galėjo būti nulemti dozei jautraus *LMNA* geno haplonepakankamumo.

Šiame darbe buvo nustatytas didelių genominių pokyčių ir įgimtų širdies anomalijų ryšys. Retų (ir retų  $\geq 501$  kb dydžio) KSP dažnis tiriamojoje grupėje, apimant tiek sindromines ĮŠY, ĮŠY su kitomis įgimtomis raidos anomalijomis ir / ar dismorfiniais požymiais, tiek izoliuotas ĮŠY, buvo reikšmingai didesnis, palyginti su kontrolinės grupės KSP dažniu. Reti geniniai KSP 2,65 karto dažniau pasireiškė ĮŠY turinčių tiriamųjų grupėje, o dideli ( $\geq 501$  kb dydžio) reti geniniai KSP buvo net 6,63 karto reikšmingai dažnesni tiriamųjų, turinčių širdies ydas.

Nepaisant skirtumų tarp ĮŠY fenotipų tyrimų dizaino ir genotipavimo lustų skiriamosios gebos, daugeliu tyrimų nustatytas reikšmingai didesnis dažnis retų, didelių ir / ar *de novo* KSP įgimtų širdies ydų populiacijoje. Silversides su kolegomis nustatė, kad dideli, reti KSP buvo dažnesni tiriamųjų, turinčių tetradą Fallot, grupėje, palyginti su kontroline grupe (8,8 proc. tiriamojoje grupėje, palyginti su 4,33 proc. kontrolinėje grupėje,  $p = 0,0117$ ) [Silversides *et al.*, 2012]. Kitų tyrimų nustatyta 12,7 proc. *de novo* KSP, iš kurių 5,6 proc. buvo reikšmingai susiję su ĮŠY, palyginti su 2 proc. kontrolinėje grupėje [Warburton *et al.*, 2014]. Greenway su kolegomis nustatė, kad 10 proc. izoliuotų, sporadinių TF lemia *de novo* KSP variantai, palyginti su 4 proc. kontrolinėje grupėje [Greenway *et al.*, 2009].

Šio darbo rezultatai parodė, kad reti geniniai KSP, ir ypač retos geninės delecijos, kurių buvo 4,02 karto reikšmingai dažniau ĮŠY turinčių tiriamųjų grupėje, yra susijusios su širdies ydomis. Buvo nustatytas reikšmingas skirtumas tarp genų, kuriuos apima reti geniniai KSP, skaičiaus vidutinės reikšmės. Galima daryti išvadą, kad retos delecijos ir duplikacijos, apimančios vidutiniškai keliskart daugiau genų, lemia didesnę ĮŠY riziką.

Haplonepakankamumas yra fenomenali diploidinių organizmų savybė, apibūdinama funkcionalios geno kopijos funkcijos praradimu, lemiančiu geno produkto nepakankamumą ir pakitusį fenotipą, kuris dažniausiai yra

patologinis. Vieną iš funkcionalių geno kopijų dažniausiai inaktyvina taškinės mutacijos ar chromosomų persitvarkymai, iš jų ir KSP [Huang *et al.*, 2010]. Geno haplonepakankamumo įverčio (HI) reikšmė varijuoja tarp 0–100 proc. ir rodo didelį geno haplonepakankamumą, kai haplonepakankamumo įverčio reikšmė HI = 0–10 proc., ir mažą, kai – HI = 90–100 proc. Šio tyrimo rezultatai parodė, kad reti geniniai KSP apėmė 2,45 daugiau HI genų ĮŠY turinčių tiriamųjų grupėje, palyginti su kontroline grupe, ir šis skirtumas buvo statistiškai reikšmingas ( $p = 0,0187$ ). Didelis genų, kuriuos apėmė reti geniniai KSP, haplonepakankamumas rodo, kad šiame tyrime nustatyti reti geniniai KSP yra galimai funkciškai reikšmingi.

Šiuo tyrimu nustatyta, kad plataus masto LGH genotipavimas yra efektyvus genetinių ĮŠY priežasčių nustatymo metodas, o bioinformacinė biologinių procesų ir molekulinė kelių analizė parodo galimą šių kelių sąveiką kardiogenezės metu. Patogeniniai KSP, apimantys su ĮŠY žinomus / siejamus genus, sudaro reikšmingą ĮŠY patogenezę lemiančių genominių variantų dalį. Gauti rezultatai rodo ĮŠY būdingą didelį fenotipinį ir genetinį heterogeniškumą ir atskleidžia galimai genus kandidatus šioje įgimtų vystymosi defektų grupėje. Tačiau reikia tolesnių ir platesnių tyrimų, patvirtinsiančių šių genų dalyvavimą ĮŠY patogenezėje.

## IŠVADOS

1. Tiriamųjų įgimtoms širdies ydoms būdingas fenotipinis heterogeniškumas ir kompleksiškas:
  - įgimtos širdies ydos, pasireiškiančios kartu su kitomis įgimtomis raidos anomalijomis ir / ar dismorfinais požymiais, sudarė 68,18 proc., 18,94 proc. įgimtų širdies ydų buvo vienas iš klinikinių genetinio sindromo požymių, 12,88 proc. įgimtos širdies ydos buvo izoliuotos;
  - dažniausios yra įgimtos širdies ydos su normaliomis segmentinėmis jungtimis – 71,43 proc., tarp kurių didžiausią dalį sudaro pertvarų defektai – 34,92 proc.;
  - anatomiškai izoliuotos įgimtos širdies ydos sudarė 49,21 proc., kompleksinės įgimtos širdies ydos – 50,79 proc. visų įgimtų širdies anomalijų.
  - nustatyta reikšminga stambiųjų kraujagyslių anomalijų ir lyties moterų grupėje priklausomybė ( $p = 0,029$ ), tačiau pagal atskiras įgimtų širdies ydų grupes reikšmingų rezultatų nenustatyta ( $p > \alpha$ ,  $\alpha = 0,05$ ).
2. Patogeniniai kopijų skaičiaus pokyčiai yra dažni priežastiniai variantai sindrominių įgimtų širdies ydų ir įgimtų širdies ydų, pasireiškiančių su kitomis įgimtomis raidos anomalijomis, etiologijoje:
  - nustatyta 17,39 proc. patogeninių kopijų skaičiaus pokyčių, iš kurių 56,82 proc. – sindrominių įgimtų širdies ydų grupėje ir 43,18 proc. – įgimtų širdies ydų, pasireiškiančių su kitomis įgimtomis raidos anomalijomis ir /ar dismorfinais požymiais grupėje;
  - 38,64 proc. patogeninių kopijų skaičiaus pokyčių apėmė žinomus įgimtų širdies ydų genus ir lėmė sindromines įgimtas širdies ydas.
3. Nustatyti 8 įgimtų širdies ydų genai kandidatai – *FGF9*, *BMPRIA*, *PTEN*, *ANKRD17*, *NPPA*, *LMNA*, *NFATC1* ir *IFT88*. Širdies vystymesi dalyvaujantys genai kandidatai dėl pakitusios raiškos galimai lemia įgimtas širdies ydas.
4. Plataus masto vieno nukleotido polimorfizmo – lyginamosios genomo hibridizacijos metodo diagnostinis efektyvumas įgimtų širdies ydų grupėje buvo 34,4 proc. Ekskliudavus genetinių sindromų, kuriuose nustatyti žinomi įgimtų širdies ydų genai, atvejus, diagnostinis naujų patogeninių kopijų skaičiaus pokyčių nustatymo efektyvumas siekia 18,94 proc.
5. Reti, dideli kopijų skaičiaus pokyčiai (retos delecijos ir duplikacijos), apimantys vidutiniškai keliskart daugiau genų, galimai lemia didesnę įgimtų širdies ydų riziką:



- reti geniniai kopijų skaičiaus pokyčiai pasireiškė 2,65 karto dažniau įgimtas širdies ydas turinčių tiriamųjų grupėje negu kontrolinėje grupėje ( $p < 0,0001$ );
- reti geniniai kopijų skaičiaus pokyčiai apėmė 2,45 karto daugiau genų, pasižyminčių dideliu haplonepakankamumu, įgimtų širdies ydų tiriamųjų grupėje negu kontrolinėje grupėje ( $p = 0,0187$ ).

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abbott ME. Atlas of congenital cardiac disease. New York: American Heart Association. 1936.
2. Abdul-Sater Z, Yehya A, Beresian J, Salem E, Kamar A, Baydoun S, Shibbani K, Soubra A, Bitar F, Nemer G: Two Heterozygous Mutations in NFATC1 in a Patient with Tricuspid Atresia. PLoS ONE. 2012, 7: e49532.
3. Al Turki S, Manickaraj AK, Mercer CL, Gerety SS, Hitz MP, Lindsay S, D'Alessandro LC, Swaminathan GJ, Bentham J, Arndt AK, Louw J, Breckpot J, Gewillig M, Thienpont B, Abdul-Khaliq H, Harnack C, Hoff K, Kramer HH, Schubert S, Siebert R, Toka O, Cosgrove C, Watkins H, Lucassen AM, O'Kelly IM, Salmon AP, Bu'lock FA, Granados-Riveron J, Setchfield K, Thornborough C, Brook JD, Mulder B, Klaassen S, Bhattacharya S, Devriendt K, Fitzpatrick DF, UK10K Consortium, Wilson DI, Mital S, Hurles ME: Rare variants in NR2F2 cause congenital heart defects in humans. Am J Hum Genet. 2014, 94:574–585.
4. Aleksiūnienė B, Preiksaitienė E, Morkūnienė A, Ambrozaitytė L, Utkus A: A de novo 1q22q23.1 Interstitial Microdeletion in a Girl with Intellectual Disability and Multiple Congenital Anomalies Including Congenital Heart Defect. Cytogenet Genome Res. 2018, 154:6–11.
5. Allan LD, Sharland GK, Milburn A, Lockhart SM, Groves AM, Anderson RH, Cook AC, Fagg NL: Prospective diagnosis of 1,006 cases of congenital heart disease in the fetus. J Am Coll Cardiol. 1994, 23:1452–1458.
6. Alliman S, Coppinger J, Marcadier J, Thiese H, Brock P, Shafer S, Weaver C, Asamoah A, Leppig K, Dyack S, Morash B, Schultz R, Torchia BS, Lamb AN, Bejjani BA: Clinical and molecular characterization of individuals with recurrent genomic disorder at 10q22.3q23.2. Clinical Genetics. 2010, 78: 162–168.
7. Amberger JS, Bocchini CA, Schiettecatte F, Scott AF, Hamosh A: OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders. Nucleic Acids Research 2015, 43, Database issue: D789–D798.
8. Ammirabile G, Tessari A, Pignataro V, Szumska D, Sutera Sardo F, Benes JJr, Balistreri M, Bhattacharya S, Sedmera D, Campione M: Pitx2 confers left morphological, molecular, and functional identity to the sinus venosus myocardium. Cardiovasc Res. 2012, 93:291–301.
9. An Y, Duan W, Huang G, Chen X, Li L, Nie C, Hou J, Gui Y, Wu Y, Zhang F, Shen Y, Wu B, Wang H: Genome-wide copy number variant analysis

- for congenital ventricular septal defects in Chinese Han population. *BMC Medical Genomics*. 2016, 9:2.
10. Andersen TA, Troelsen KL, Larsen LA: Of mice and men: molecular genetics of congenital heart disease. *Cell Mol Life Sci*. 2014, 71:1327–1352.
  11. Anderson RH, Brown NA, Mohun TJ, Moorman AF: Insights from Cardiac Development Relevant to Congenital Defects and Adult Clinical Anatomy. *J Cardiovasc Transl Res*. 2013a, 6:107–117.
  12. Anderson RH, Spicer DE, Hlavacek AM, Cook AC, Backer CL: *Wilcox's Surgical Anatomy of The Heart*. Cambridge: Cambridge University Press. 2013b.
  13. Antonarakis SE, Lyle R, Dermitzakis ET, Reymond A, Deutsch S: Chromosome 21 and Down syndrome: from genomics to pathophysiology. *Nat Rev Genet*. 2004, 5:725–738.
  14. Attenhofer Jost CH, Connolly HM, Dearani JA, William DE, Danielson GK: Ebstein's anomaly. *Circulation*. 2007, 115:277–285.
  15. Azamian M, Lalani SR: Cytogenomic Aberrations in Congenital Cardiovascular Malformations. *Mol Syndromol*. 2016, 7:51–61.
  16. Bachman KK, Deward SJ, Chrysostomou C, Munoz R, Madan-Khetarpal S: Array CGH as a first-tier test for neonates with congenital heart disease. *Cardiol Young*. 2015, 25:115–122.
  17. Bailliard F, Anderson RH: Tetralogy of Fallot. *Orphanet J Rare Dis*. 2009, 4:2.
  18. Bajolle F, Zaffran S, Bonnet D: Genetics and embryological mechanisms of congenital heart diseases. *Arch Cardiovasc Dis*. 2009, 102:59–63.
  19. Basson CT, Huang T, Lin RC, Bachinsky DR, Weremowicz S, Vaglio A, Bruzzone R, Quadrelli R, Lerone M, Romeo G, Silengo M, Pereira A, Krieger J, Mesquita SF, Kamisago M, Morton CC, Pierpont ME, Müller CW, Seidman JG, Seidman CE: Different TBX5 interactions in heart and limb defined by Holt-Oram syndrome mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999, 96:2919–2924.
  20. Battaglia A, Filippi T, Carey JC: Update on the clinical features and natural history of Wolf-Hirschhorn (4p-) syndrome: experience with 87 patients and recommendations for routine health supervision. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2008, 148C:246–251.
  21. Bauer RC, Laney AO, Smith R, Gerfen J, Morrissette JJ, Woyciechowski S, Garbarini J, Loomes KM, Krantz ID, Urban Z, Gelb BD, Goldmuntz E, Spinner NB: Jagged1 (JAG1) mutations in patients with tetralogy of Fallot or pulmonic stenosis. *Hum Mutat*. 2010, 31:594–601.

22. Baumgartner H, Bonhoeffer P, De Groot NM, de Haan F, Deanfield JE, Galie N, Gatzoulis MA, Gohlke-Baerwolf C, Kaemmerer H, Kilner P, Meijboom F, Mulder BJ, Oechslin E, Oliver JM, Serraf A, Szatmari A, Thaulow E, Vouhe PR, Walma E; Task Force on the Management of Grown-up Congenital Heart Disease of the European Society of Cardiology (ESC); Association for European Paediatric Cardiology (AEPC); ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). ESC Guidelines for the management of grown-up congenital heart disease (new version 2010). *Eur Heart J*. 2010, 31:2915–2957.
23. Bédard E, McCarthy KP, Dimopoulos K, Giannakoulas G, Gatzoulis MA, Ho SY: Structural abnormalities of the pulmonary trunk in tetralogy of Fallot and potential clinical implications: a morphological study. *J Am Coll Cardiol*. 2009, 54:1883–1890.
24. Benson DW, Silberbach MG, Kavanaugh-McHugh A, Cottrill C, Zhang Y, Riggs S, Smalls O, Johnson MC, Watson MS, Seidman JG, Seidman CE, Plowden J, Kugler JD: Mutations in the cardiac transcription factor NKX2.5 affect diverse cardiac developmental pathways. *J. Clin. Invest*. 1999, 104:1567–1573.
25. Billett J, Majeed A, Catzoulis M, Cowie M: Trends in hospital admissions, in-hospital case fatality and population mortality from congenital heart disease in England, 1994 to 2004. *Heart*. 2008, 94:342–348.
26. Bittles AH: Assessing the influence of consanguinity on congenital heart disease. *Annals of Pediatric Cardiology*. 2011, 4:111–116.
27. Blalock A, Taussig HB: The surgical treatment of malformations of the heart in which there is pulmonary stenosis or pulmonary atresia. *JAMA*. 1945, 128:189–202.
28. Blue GM, Kirk EP, Giannoulatou E, Dunwoodie SL, Ho JW, Hilton DC, White SM, Sholler GF, Harvey RP, Winlaw DS: Targeted next-generation sequencing identifies pathogenic variants in familial congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol*. 2014, 64:2498–2506.
29. Blue GM, Kirk EP, Sholler GF, Harvey RP, Winlaw DS: Congenital heart disease: current knowledge about causes and inheritance. *Med J Aust*. 2012, 197:155–159.
30. Bonachea EM, Chang S-W, Zender G, LaHaye S, Fitzgerald-Butt S, McBride KL, Garg V: Rare GATA5 sequence variants identified in individuals with bicuspid aortic valve. *Pediatr Res*. 2014, 76:211–216.
31. Bondy CA. Turner syndrome 2008. *Horm Res*. 2009, 71:52–56.
32. Botto LD, Correa A, Erickson JD: Racial and temporal variations in the prevalence of heart defects. *Pediatrics*. 2001, 107:E32.

33. Botto LD, Lin AE, Riehle–Colarusso T, Malik S, Correa A: Seeking causes: Classifying and evaluating congenital heart defects in etiologic studies. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2007, 79:714–727.
34. Bragin E, Chatzimichali EA, Wright CF, Hurles ME, Firth HV, Bevan AP, Swaminathan GJ: DECIPHER: database for the interpretation of phenotype–linked plausibly pathogenic sequence and copy–number variation. *Nucleic Acids Research.* 2014, 42, Database issue: D993–D1000.
35. Breckpot J, Thienpont B, Arens Y, Tranchevent LC, Vermeesch JR, Moreau Y, Gewillig M, Devriendt K: Challenges of interpreting copy number variation in syndromic and non–syndromic congenital heart defects. *Cytogenet Genome Res.* 2011, 135:251–259.
36. Breckpot J, Thienpont B, Peeters H, de Ravel T, Singer A, Rayyan M, Allegaert K, Vanhole C, Eyskens B, Vermeesch JR, Gewillig M, Devriendt K: Array comparative genomic hybridization as a diagnostic tool for syndromic heart defects. 2010, *J Pediatr* 156:810–817.
37. Breckpot J, Tranchevent LC, Thienpont B, Bauters M, Troost E, Gewillig M, Vermeesch JR, Moreau Y, Devriendt K, Van Esch H: *BMPR1A* is a candidate gene for congenital heart defects associated with the recurrent 10q22q23 deletion syndrome. *European Journal of Medical Genetics.* 2012, 55:12–6.
38. Brodwall K, Greve G, Elisabeth Leirgul E, Tell GS, Vollset SE, Øyen N: Recurrence of congenital heart defects among siblings – a nationwide study. *Am J Med Genet.* 2017, 173A:1575–1585.
39. Bruneau BG: The developmental genetics of congenital heart disease. *Nature.* 2008, 451:943–948.
40. Bruneau BG: Atrial natriuretic factor in the developing heart: a signpost for cardiac morphogenesis. *Can J Physiol Pharmacol.* 2011, 89:533–537.
41. Burnside RD: 22q11.21 Deletion Syndromes: A Review of Proximal, Central, and Distal Deletions and Their Associated Features. *Cytogenet Genome Res.* 2015, 146:89–99.
42. Butler MG: Clinical and Genetic Aspects of the 15q11.2 BP1–BP2 Microdeletion Disorder. *J Intellect Disabil Res.* 2017, 61: 568–579.
43. Campbell M: Genetic and environmental factors in congenital heart disease. *QJM,* 1949, 18:379–391.
44. Carey AS, Gelb BD: Molecular Genetics of Congenital Heart Disease. In: Cheng L., Zhang D., Eble J. (eds) *Molecular Genetic Pathology.* Springer, New York, NY, 2013, 591–605.
45. Carey AS, Liang L, Edwards J, Brandt T, Mei H, Sharp AJ, Hsu DT, Newburger JW, Ohye RG, Chung WK, Russell MW, Rosenfeld JA, Shaffer LG, Parides MK, Edelmann L, Gelb BD: Effect of copy number variants

- on outcomes for infants with single ventricle heart defects. *Circ Cardiovasc Genet*, 2013, 6:444–451.
46. Catela C, Bilbao–Cortes D, Slonimsky E, Kratsios P, Rosenthal N, Te Welscher P: Multiple congenital malformations of Wolf–Hirschhorn syndrome are recapitulated in *Fgfr11* null mice. *Dis Model Mech*. 2009, 2:283–294.
  47. Chai JH, Locke DP, Greally JM, Knoll JH, Ohta T, Dunai J, Yavor A, Eichler EE, Nicholls RD: Identification of four highly conserved genes between breakpoint hotspots BP1 and BP2 of the Prader–Willi/Angelman syndromes deletion region that have undergone evolutionary transposition mediated by flanking duplicons. *Am J Hum Genet* 2003, 73:898–925.
  48. Chaix MA, Andelfinger G, Khairy P: Genetic testing in congenital heart disease: A clinical approach. *World J Cardiol*. 2016, 8:180–191.
  49. Changela V, John C, Maheshwari S: Unusual cardiac associations with Tetralogy of Fallot—a descriptive study. *Pediatr Cardiol*. 2010, 6:785–791.
  50. Chehab G, Chedid P, Saliba Z, Bouvagnet P: Congenital cardiac disease and inbreeding: specific defects escape higher risk due to parental consanguinity. *Cardiol Young*. 2007, 17:414–422.
  51. Chen J, Bardes EE, Chen J, Bardes EE, Aronow BJ, Jegga AG: ToppGene Suite for gene list enrichment analysis and candidate gene prioritization. *Nucleic Acids Res*. 2009, 37 (Web Server issue):W305–311.
  52. Ching YH, Ghosh TK, Cross SJ, Packham EA, Honeyman L, Loughna S, Robinson TE, Dearlove AM, Ribas G, Bonser AJ, Thomas NR, Scotter AJ, Caves LS, Tyrrell GP, Newbury-Ecob RA, Munnich A, Bonnet D, Brook JD: Mutation in myosin heavy chain 6 causes atrial septal defect. *Nat Genet* 2005, 37: 423–428.
  53. Chung BHY, Tao VQ, Tso WWY: Copy number variation and autism: New insights and clinical implications. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2014, 113: 400–408.
  54. Čiuladaitė Ž, Preikšaitienė E, Kasnauskienė J, Utkus A, Cimbalistienė L, Matulevičienė A, Pečiulytė A, Ambrozaitytė L, Aleksiūnienė B, Dirsė V, Kučinskas V: Molekulinis kariotipavimas ir intelektinės negalios genetinės priežastys: klinikiniai atvejai. *Sveikatos mokslai*. 2012, 22: 67–72.
  55. Clark EB. Mechanism in the pathogenesis of congenital cardiac malformations. In: Pierpont ME, Moller JH, editors. *Genetics of Cardiovascular Disease*. Boston, MA: Martinus Nijhoff Publishing. 1986, p. 3–11.
  56. Clement CA, Kristensen SG, Møllgård K, Pazour GJ, Yoder BK, Larsen LA, Christensen ST: The primary cilium coordinates early cardiogenesis

- and hedgehog signaling in cardiomyocyte differentiation. *J Cell Sci.* 2009, 122: 3070–3082.
57. Colella S, Yau C, Taylor JM, Mirza G, Butler H, Clouston P, Bassett AS, Seller A, Holmes CC, Ragoussis J: QuantiSNP: an Objective Bayes Hidden–Markov Model to detect and accurately map copy number variation using SNP genotyping data. *Nucleic Acids Res.* 2007, 35:2013–2025.
  58. Connor JA, Hinton RB, Miller EM, Sund KL, Ruschman JG, Ware SM: Genetic testing practices in infants with congenital heart disease. *Congenit Heart Dis.* 2014, 9:158–167.
  59. Conrad DF, Pinto D, Redon R, Feuk L, Gokcumen O, Zhang Y, Aerts J, Andrews TD, Barnes C, Campbell P, Fitzgerald T, Hu M, Ihm CH, Kristiansson K, Macarthur DG, Macdonald JR, Onyiah I, Pang AW, Robson S, Stirrups K, Valsesia A, Walter K, Wei J; Wellcome Trust Case Control Consortium, Tyler-Smith C, Carter NP, Lee C, Scherer SW, Hurles ME: Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature.* 2010, 464:704–712.
  60. Cooper GM, Coe BP, Girirajan S, Rosenfeld JA, Vu TH, Baker C, Williams C, Stalker H, Hamid R, Hannig V, Abdel-Hamid H, Bader P, McCracken E, Niyazov D, Leppig K, Thiese H, Hummel M, Alexander N, Gorski J, Kussmann J, Shashi V, Johnson K, Rehder C, Ballif BC, Shaffer LG, Eichler EE: A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat Genet.* 2011; 43:838–846.
  61. Costain G, Silversides CK, Bassett AS: The importance of copy number variation in congenital heart disease. *Genomic Medicine.* 2016, 1:16031.
  62. Cox DM, Butler M: The 15q11.2 BP1–BP2 microdeletion syndrome: A review. *International Journal of Molecular Sciences.* 2015, 16:4068–4082.
  63. Crabtree GR, Olson EN: NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell.* 2002;109 (Suppl):S67–S79.
  64. Dadvand P, Rankin J, Rushton S, Pless-Mulloli T: Ambient air pollution and congenital heart disease: a registerbased study. *Environ Res.* 2011, 111:435–441.
  65. Dasgupta C, Martinez A–M, Zuppan CW, Shah MM, Bailey LL, Fletcher WH: Identification of connexin43 (alpha-1) gap junction gene mutations in patients with hypoplastic left heart syndrome by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Mutat. Res.* 2001, 479:173–186.
  66. de la Pompa JL, Timmerman LA, Takimoto H, Yoshida H, Elia AJ, Samper E, Potter J, Wakeham A, Marengere L, Langille BL, Crabtree GR, Mak TW: Role of the NF–ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum. *Nature.* 1998, 392:182–186.

67. del Pasqua A, Rinelli G, Toscano A, Iacobelli R, Digilio C, Marino B, Saffirio C, Mondillo S, Pasquini L, Sanders SP, de Zorzi A: New findings concerning cardiovascular manifestations emerging from long-term follow-up of 150 patients with the Williams–Beuren syndrome. *Cardiol Young*. 2009, 19:563–567.
68. Depreux FF, Puckelwartz MJ, Augustynowicz A, Wolfgeher D, Labno CM, Pierre–Louis D, Cicka D, Kron SJ, Holaska J, McNally EM: Disruption of the lamin A and matrin–3 interaction by myopathic LMNA mutations. *Hum Mol Genet*. 2015, 24:4284–4295.
69. Derwinska K, Bartnik M, Wisniowiecka–Kowalnik B, Jagla M, Rudzinski A, Pietrzyk JJ, Kawalec W, Ziólkowska L, Kutkowska–Każmierczak A, Gambin T, Sykulski M, Shaw CA, Gambin A, Mazurczak T, Obersztyn E, Bocian E, Stankiewicz P: Assessment of the role of copy–number variants in 150 patients with congenital heart defects. *Med Wieku Rozwoj*. 2012, 16:175–182.
70. Dietz HC, Cutting GR, Pyeritz RE, Maslen CL, Sakai LY, Corson GM, Puffenberger EG, Hamosh A, Nanthakumar EJ, Curristin SM, Stetten G, Meyers DA, Francoman CA: Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature*. 1991, 352:337–339.
71. Digilio MC, Casey B, Toscano A, Calabrò R, Pacileo G, Marasini M, Banaudi E, Giannotti A, Dallapiccola B, Marino B: Complete Transposition of the Great Arteries: Patterns of Congenital Heart Disease in Familial Precurrence. *Circulation*. 2001a, 104:2809–2814.
72. Digilio MC, Marino B, Toscano A, Giannotti A, Dallapiccola B: Congenital heart defects in Kabuki syndrome. *American Journal of Medical Genetics*. 2001b, 4:269–274.
73. Donald–McGinn DM, Zackai EH: Genetic counseling for the 22q11.2 deletion. *Dev Disabil Res Rev*. 2008, 14:69–74.
74. Dorn KV, Hughes CE, Rohatgi R: A Smoothened–Evc2 Complex Transduces the Hedgehog Signal at Primary Cilia. *Developmental Cell*. 2012, 23:823–835.
75. Dulskienė V, Gražulevičienė R: Kenksmingi aplinkos veiksniai bei oro užterštumas formaldehidu ir įgimtos širdies anomalijos. *Medicina*. 2005, 41:787–795.
76. Eldadah ZA, Hamosh A, Biery NJ, Montgomery RA, Duke M, Elkins R, Dietz HC: Familial Tetralogy of Fallot caused by mutation in the jagged1 gene. *Hum Mol Genet*. 2001, 10:163–169.
77. Ellesøe SG, Workman CT, Bouvagnet P, Loffredo CA, McBride KL, Hinton RB, van Engelen K, Gertsen EC, Mulder BJM, Postma AV, Anderson RH, Hjortdal VE, Brunak S, Larsen LA: Familial co-occurrence



- of congenital heart defects follows distinct patterns. *Eur Heart J*. 2018, 39:1015–1022.
78. Erdogan F, Larsen LA, Zhang L, Tumer Z, Tommerup N, Chen W, Jacobsen JR, Schubert M, Jurkatis J, Tzschach A, Ropers HH, Ullmann R: High frequency of submicroscopic genomic aberrations detected by tiling path array comparative genome hybridisation in patients with isolated congenital heart disease. *J Med Genet*. 2008, 45:704–709.
  79. Eronen M, Peippo M, Hiippala A, Raatikka M, Arvio M, Johansson R, Kahkonen M: Cardiovascular manifestations in 75 patients with Williams syndrome. *J Med Genet*. 2002, 39:554–558.
  80. Fahed AC, Gelb BD, Seidman JG, Seidman CE: Genetics of congenital heart disease: the glass half empty. *Circ Res*. 2013, 112: 707–720.
  81. Fakhro KA, Choi M, Ware SM, Belmont JW, Towbin JA, Lifton RP, Khokha MK, Brueckner M: Rare copy number variations in congenital heart disease patients identify unique genes in left–right patterning. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011, 108:2915–2920.
  82. Falco M, Amabile S, Acqaviva F: RAI1 gene mutations: mechanisms of Smith–Magenis syndrome. *The Application of Clinical Genetics*. 2017, 10:85–94.
  83. Feenstra I, Fang J, Koolen DA, Siezen A, Evans C, Winter RM, Lees MM, Riegel M, de Vries BB, Van Ravenswaaij CM, Schinzel A: European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations (ECARUCA); an online database for rare chromosome abnormalities. *European Journal of Medical Genetics*. 2006, 49:279–291.
  84. Ferencz C, Rubin JD, Loffredo C, Magee CA: *Epidemiology of congenital heart disease: the Baltimore–Washington Infant Study: 1981–1989*. Futura Publishing Co., Mount Kisco, NY, 1993.
  85. Feuk L, Marshall CR, Wintle RF, Scherer SW: Structural variants: changing the landscape of chromosomes and design of disease studies. *Hum Mol Genet*. 2006, 15:R57–R66.
  86. Franklin RC, Jacobs JP, Krogmann ON, Béland MJ, Aiello VD, Colan SD, Elliott MJ, William Gaynor J, Kurosawa H, Maruszewski B, Stellin G, Tchervenkov CI, Walters Iii HL, Weinberg P, Anderson RH: Nomenclature for congenital and paediatric cardiac disease: historical perspectives and The International Pediatric and Congenital Cardiac Code. *Cardiol Young*. 2008, 2:70–80.
  87. Freeman SB, Bean LH, Allen EG, Tinker SW, Locke AE, Druschel C, Hobbs CA, Romitti PA, Royle MH, Torfs CP, Dooley KJ, Sherman SL: Ethnicity, sex, and the incidence of congenital heart defects: a report from the national Down syndrome project. *Genet Med*. 2008, 10:173–180.

88. Frescura C, Angelini A, Daliento L, Thiene G: Morphological aspects of Ebstein's anomaly in adults. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2000, 48:203–208.
89. Funato N, Nakamura M, Richardson JA, Srivastava D, Yanagisawa H: Tbx1 regulates oral epithelial adhesion and palatal development. *Hum Mol Genet.* 2012, 21:2524–2537.
90. Garg V, Kathiriyia IS, Barnes R, Schluterman MK, King IN, Butler CA, Rothrock CR, Eapen RS, Hirayama-Yamada K, Joo K, Matsuoka R, Cohen JC, Srivastava D: GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature.* 2003, 424:443–447.
91. Garg V, Muth AN, Ransom JF, Schluterman MK, Barnes R, King IN, Grossfeld PD, Srivastava D: Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature.* 2005, 437: 270–274.
92. Gaussin V, Van de Putte T, Mishina Y, Hanks MC, Zwijsen A, Huylebroeck D, Behringer RR, Schneide MD: Endocardial cushion and myocardial defects after cardiac myocyte-specific conditional deletion of the bone morphogenetic protein receptor ALK3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2002, 99:2878–2883.
93. Gelb BD: History of Our Understanding of the Causes of Congenital Heart Disease. *Circ Cardiovasc Genet.* 2015, 8: 529–536.
94. Geng J, Picker J, Zheng Z, Zhang X, Wang J: Chromosome microarray testing for patients with congenital heart defects reveals novel disease causing loci and high diagnostic yield. *BMC Genomics.* 2014, 15:1127.
95. Gilboa SM, Devine OJ, Kucik JE, Oster ME, Riehle-Colarusso T, Nemhard WN, Xu P, Correa A, Jenkins K, Marelli A: Congenital Heart Defects in the United States. Estimating the Magnitude of the Affected Population in 2010. *Circulation.* 2016, 134:101–109.
96. Gill HK, Splitt M, Sharland GK, Simpson JM: Patterns of recurrence of congenital heart disease: an analysis of 6,640 consecutive pregnancies evaluated by detailed fetal echocardiography. *J Am Coll Cardiol.* 2003, 42:923–929.
97. Glessner JT, Bick AG, Ito K, Homsy J, Rodriguez-Murillo L, Fromer M, Mazaika E, Vardarajan B, Italia M, Leipzig J, DePalma SR, Golhar R, Sanders SJ, Yamrom B, Ronemus M, Iossifov I, Willsey AJ, State MW, Kaltman JR, White PS, Shen Y, Warburton D, Brueckner M, Seidman C, Goldmuntz E, Gelb BD, Lifton R, Seidman J, Hakonarson H, Chung WK: Increased frequency of de novo copy number variants in congenital heart disease by integrative analysis of single nucleotide polymorphism array and exome sequence data. *Circ Res.* 2014, 115:884–896.

98. Glessner JT, Bick AG, Ito K, Homsy J, Rodriguez-Murillo L, Fromer M, Mazaika E, Vardarajan B, Italia M, Leipzig J, DePalma SR, Golhar R, Sanders SJ, Yamrom B, Ronemus M, Iossifov I, Willsey AJ, State MW, Kaltman JR, White P, Shen Y, Warburton D, Brueckner M, Seidman C, Goldmuntz E, Gelb BD, Lifton R, Seidman J, Hakonarson H, Chung WK: The Increased Frequency of De Novo Copy Number Variations in Congenital Heart Disease by Integrative Analysis of SNP Array and Exome Sequence Data. *Circ Res.* 2014, 115: 884–896.
99. Goldmuntz E, Paluru P, Glessner J, Hakonarson H, Biegel JA, White PS, Gai X, Shaikh TH: Microdeletions and microduplications in patients with congenital heart disease and multiple congenital anomalies. *Congenit Heart Dis.* 2011, 6:592–602.
100. Goldmuntz E, Geiger E, Benson DW: NKX2.5 mutations in patients with tetralogy of Fallot. *Circulation.* 2001, 104:2565–2568.
101. Goldmuntz E: DiGeorge syndrome: new insights. *Clin Perinatol.* 2005, 32:963–978.
102. Goodship JA, Hall D, Topf A, Mamasoula C, Griffin H, Rahman TJ, Glen E, Tan H, Palomino Doza J, Relton CL, Bentham J, Bhattacharya S, Cosgrove C, Brook D, Granados-Riveron J, Bu'Lock FA, O'Sullivan J, Graham Stuart A, Parsons J, Cordell HJ, Keavney B: A Common Variant in the PTPN11 Gene Contributes to the Risk of Tetralogy of Fallot. *Circ Cardiovasc Genet.* 2012, 5:287–292.
103. Greenway SC, Pereira AC, Lin JC, DePalma SR, Israel SJ, Mesquita SM, Ergul E, Conta JH, Korn JM, McCarroll SA, Gorham JM, Gabriel S, Altshuler DM, Quintanilla-Dieck Mde L, Artunduaga MA, Eavey RD, Plenge RM, Shadick NA, Weinblatt ME, De Jager PL, Hafler DA, Breitbart RE, Seidman JG, Seidman CE: De novo copy number variants identify new genes and loci in isolated sporadic tetralogy of Fallot. *Nat Genet.* 2009, 41:931–935.
104. Gripp KW, Lin AE: Costello syndrome: a Ras/mitogen activated protein kinase pathway syndrome (rasopathy) resulting from HRAS germline mutations. *Genet Med.* 2012, 14:285–292.
105. Gross RE, Hubbard JP. Surgical ligation of a patent ductus arteriosus. Report of first successful case. *JAMA.* 1939, 112:729–731.
106. Guo DC, Pannu H, Tran-Fadulu V, Papke CL, Yu RK, Avidan N, Bourgeois S, Estrera AL, Safi HJ, Sparks E, Amor D, Ades L, McConnell V, Willoughby CE, Abuelo D, Willing M, Lewis RA, Kim DH, Scherer S, Tung PP, Ahn C, Buja LM, Raman CS, Shete SS, Milewicz DM: Mutations in smooth muscle  $\alpha$ -actin (ACTA2) lead to thoracic aortic aneurysms and dissections. *Nature Genetics.* 2007, 39:1488–1493.

107. Gupta P, Bilinska ZT, Sylvius N, Boudreau E, Veinot JP, Labib S, Bolongo PM, Hamza A, Jackson T, Ploski R, Walski M, Grzybowski J, Walczak E, Religa G, Fidzianska A, Tesson F: Genetic and ultrastructural studies in dilated cardiomyopathy patients: a large deletion in the lamin A/C gene is associated with cardiomyocyte nuclear envelope disruption. *Basic Res Cardiol.* 2010, 105:365–377.
108. Guris DL, Fantes J, Tara D, Druker BJ, Imamoto A: Mice lacking the homologue of the human 22q11.2 gene CRLK phenocopy neurocristopathies of DiGeorge syndrome. *Nature Genetics.* 2001, 27:293–298.
109. Hanchard NA, Umana LA, D'Alessandro L, Azamian M, Poopola M, Morris SA, Fernbach S, Lalani SR, Towbin JA, Zender GA, Fitzgerald-Butt S, Garg V, Bowman J, Zapata G, Hernandez P, Arrington CB, Furthner D, Prakash SK, Bowles NE, McBride KL, Belmont JW: Assessment of large copy number variants in patients with apparently isolated congenital left-sided cardiac lesions reveals clinically relevant genomic events. *Am J Med Genet A.* 2017, 173:2176–2188.
110. Hamada K, Sasaki T, Koni PA, Natsui M, Kishimoto H, Junko Sasaki J, Yajima N, Horie Y, Hasegawa G, Naito M, Miyazaki J, Suda T, Itoh H, Nakao K, Mak TW, Nakano T, Suzuki A: The PTEN/PI3K pathway governs normal vascular development and tumor angiogenesis. *Genes & Development.* 2005, 19:2054–2065.
111. Hartman RJ, Rasmussen SA, Botto LD, Riehle-Colarusso T, Martin CL, Cragan JD, Shin M, Correa A: The contribution of chromosomal abnormalities to congenital heart defects: a population-based study. *Pediatr Cardiol.* 2011, 32:1147–1157.
112. Hinton RB: Genetic and Environmental Factors Contributing to Cardiovascular Malformation: A Unified Approach to Risk. *J Am Heart Assoc.* 2013; 2:e000292.
113. Hitz MP, Lemieux-Perreault LP, Marshall C, Feroz-Zada Y, Davies R, Yang Sw, Lionel AC, D'Amours G, Lemyre E, Cullum R, Bigras JL, Thibeault M, Chetaille P, Montpetit A, Khairy P, Overduin B, Klaassen S, Hoodless P, Nemer M, Stewart AF, Boerkoel C, Scherer Sw, Richter A, Dube MP, Andelfinger G: Rare copy number variants contribute to congenital left-sided heart disease. *PLoS Genet.* 2012, 8:e1002903.
114. Hoffman JI, Kaplan S, Liberthson RR: Prevalence of congenital heart disease. *Am Heart J.* 2004, 147:425–439.
115. Homsy J, Zaidi S, Shen Y, Ware JS, Samocha KE, Karczewski KJ, DePalma SR, McKean D, Wakimoto H, Gorham J, Jin SC, Deanfield J, Giardini A, Porter GA Jr, Kim R, Bilguvar K, López-Giráldez F, Tikhonova

- I, Mane S, Romano-Adesman A, Qi H, Vardarajan B, Ma L, Daly M, Roberts AE, Russell MW, Mital S, Newburger JW, Gaynor JW, Breitbart RE, Iossifov I, Ronemus M, Sanders SJ, Kaltman JR, Seidman JG, Brueckner M, Gelb BD, Goldmuntz E, Lifton RP, Seidman CE, Chung WK: De novo mutations in congenital heart disease with neurodevelopmental and other congenital anomalies. *Science*. 2015, 350:1262–1266.
116. Hou SC, Chan LW, Chou YC, Su CY, Chen X, Shih YL, Tsai PC, Shen CK, Yan YT: Ankrd17, an ubiquitously expressed ankyrin factor, is essential for the vascular integrity during embryogenesis. *FEBS Letters*. 2009, 583: 2765–2771.
117. Houweling AC, van Borren MM, Moorman AFM, Christoffels VM: Expression and regulation of the atrial natriuretic factor encoding gene *Nppa* during development and disease. *Cardiovascular Research*. 2005, 67:583–593.
118. Huang N, Lee I, Marcotte EM, Hurles ME: Characterising and predicting haploinsufficiency in the human genome. *PLoS Genet*. 2010, 6:e1001154.
119. Huang RT, Xue S, Xu YJ, Zhou M, Yang YQ: Somatic GATA5 mutations in sporadic tetralogy of Fallot. *International Journal Of Molecular Medicine*. 2014, 33:1227–1235.
120. 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, 6:949–951.
121. Iascone M, Ciccone R, Galletti L, Marchetti D, Seddio F, Lincresso AR, Pezzoli L, Vetro A, Barachetti D, Boni L, Federici D, Soto AM, Comas JV, Ferrazzi P, Zuffardi O: Identification of de novo mutations and rare variants in hypoplastic left heart syndrome. *Clin Genet*. 2012, 81:542–554.
122. Itoh N, Ohta H, Nakayama Y, Konishi M: Roles of FGF Signals in Heart Development, Health, and Disease. *Front Cell Dev Biol*. 2016; 4:110–121.
123. Jenkins KJ, Correa A, Feinstein JA, Botto LD, Britt AE, Daniels SR, Elixson M, Warnes CA, Webb CL: Non-inherited risk factors and congenital cardiovascular defects: current knowledge: a scientific statement from the American Heart Association Council on Cardiovascular Disease in the Young: endorsed by the American Academy of Pediatrics. *Circulation*. 2007, 115:2995–3014.
124. Jia Y, Louw JJ, Breckpot J, Callewaert B, Barrea C, Sznajder Y, Gewillig M, Souche E, Dehaspe L, Vermeesch JR, Lambrechts D, Devriendt K, Corveleyn A: The diagnostic value of next generation sequencing in familial nonsyndromic congenital heart defects. *Am J Med Genet A*. 2015, 167A:1822–1829.

125. Jin SC, Homsy J, Zaidi S, Lu Q, Morton S, DePalma SR, Zeng X, Qi H, Chang W, Sierant MC, Hung WC, Haider S, Zhang J, Knight J, Bjornson RD, Castaldi C, Tikhonova IR, Bilguvar K, Mane SM, Sanders SJ, Mital S, Russell MW, Gaynor JW, Deanfield J, Giardini A, Porter GA Jr, Srivastava D, Lo CW, Shen Y, Watkins WS, Yandell M, Yost HJ, Tristani-Firouzi M, Newburger JW, Roberts AE, Kim R, Zhao H, Kaltman JR, Goldmuntz E, Chung WK, Seidman JG, Gelb BD, Seidman CE, Lifton RP, Brueckner M: Contribution of rare inherited and de novo variants in 2,871 congenital heart disease probands. *Nature Genetics*. 2017, 49:1593–1601.
126. Jonavičius K, Lipnevičius A, Lebetkevičius V, Sirvydis V, Tarutis V: Stambiųjų kraujagyslių transpozicija: Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų Širdies chirurgijos centro pastarųjų penkerių metų patirtis. *Lietuvos chirurgija*. 2014, 13:31–38.
127. Kaminsky EB, Kaul V, Paschall J, Church DM, Bunke, Kunig D, Moreno-De-Luca D, Moreno-De-Luca A, Mülle JG, Warren ST, Richard G, Compton JG, Fuller AE, Gliem TJ, Huang S, Collinson MN, Beal SJ, Ackley T, Pickering DL, Golden DM, Aston E, Whitby H, Shetty S, Rossi MR, Rudd MK, South ST, Brothman AR, Sanger WG, Iyer RK, Crolla JA, Thorland EC, Aradhya S, Ledbetter DH, Martin CL: 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.
128. Karkera JD, Lee JS, Roessler E, Banerjee-Basu S, Ouspenskaia MV, Mez J, Goldmuntz E, Bowers p, Towbin J, Belmont JW, Baxevanis AD, Schier AF, Muenke M: Loss-of-Function Mutations in Growth Differentiation Factor-1 (GDF1) Are Associated with Congenital Heart Defects in Humans. *Am J Hum Genet*. 2007, 81:987–994.
129. Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, Quintero–Rivera F, South ST: American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med*. 2011, 13:680–685.
130. Kelly RG, Buckingham ME, Moorman AF: Heart fields and cardiac morphogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014, 4.
131. Kelly RG: The second heart field. *Curr Top Dev Biol*. 2012, 100:33–65.
132. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D: The human genome browser at UCSC. *Genome Res*. 2002, 12:996–1006.
133. Kim DS, Kim JH, Burt AA, Crosslin DR, Burnham N, Kim CE, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Nicolson SC, Spray TL, Stanaway IB, Nickerson DA, Heagerty PJ, Hakonarson H, Gaynor JW, Jarvik GP: Burden of

- potentially pathologic copy number variants is higher in children with isolated congenital heart disease and significantly impairs covariate-adjusted transplant-free survival. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2016, 151:1147–1151.
134. Kim DS, Kim JH, Burt AA, Crosslin DR, Burnham N, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Nicolson SC, Spray TL, Stanaway IB, Nickerson DA, Russell MW, Hakonarson H, Gaynor JW, Jarvik GP: Patient genotypes impact survival after surgery for isolated congenital heart disease. *Ann Thorac Surg.* 2014, 98:104–110.
  135. Kleefstra T, Brunner HG, Amiel J, Oudakker AR, Nillesen WM, Magee A, Geneviève D, Cormier-Daire V, van Esch H, Fryns JP, Hamel BC, Sistiernans EA, de Vries BB, van Bokhoven H: Loss-of-function mutations in euchromatin histone methyl transferase 1 (EHMT1) cause the 9q34 subtelomeric deletion syndrome. *Am J Hum Genet.* 2006, 79:370–377.
  136. Kleefstra T, van Zelst-Stams WA, Nillesen WM, Cormier-Daire V, Houge G, Foulds N, van Dooren M, Willemsen MH, Pfundt R, Turner A, Wilson M, McGaughan J, Rauch A, Zenker M, Adam MP, Innes M, Davies C, López AG, Casalone R, Weber A, Brueton LA, Navarro AD, Bralo MP, Venselaar H, Stegmann SP, Yntema HG, van Bokhoven H, Brunner HG: Further clinical and molecular delineation of the 9q subtelomeric deletion syndrome supports a major contribution of EHMT1 haploinsufficiency to the core phenotype. *J Med Genet.* 2009, 46:598–606.
  137. Kloesel B, DiNardo JA, Body SC: Cardiac Embryology and Molecular Mechanisms of Congenital Heart Disease: A Primer for Anesthesiologists. *Anesth Analg.* 2016, 123:551–569.
  138. Knowles RL, Ridout D, Crowe S, Bull C, Wray J, Tregay J, Franklin RC, Barron DJ, Cunningham D, Parslow RC, Brown KL: Ethnic and socioeconomic variation in incidence of congenital heart defects. *Arch Dis Child.* 2017, 102:496–502.
  139. Kohmoto T, Shono M, Naruto T, Watanabe M, Suga K, Nakagawa R, Kagami S, Masuda K, Imoto I: A novel frameshift mutation of CHD7 in a Japanese patient with CHARGE syndrome. *Human Genome Variation.* 2016, 3:16004.
  140. Lalani SR, Belmont JW: Genetic Basis of Congenital Cardiovascular Malformations. *Eur J Med Genet.* 2014, 57:402–413.
  141. Lalani SR, Safiullah AM, Molinari LM, Fernbach SD, Martin DM, Belmont JW: SEMA3E mutation in a patient with CHARGE syndrome. *J Med Genet.* 2004, 41:e94.

142. Lalani SR, Shaw C, Wang X, Patel A, Patterson LW, Kolodziejska K, Szafranski P, Ou Z, Tian Q, Kang SH, Jinnah A, Ali S, Malik A, Hixson P, Potocki L, Lupski JR, Stankiewicz P, Bacino CA, Dawson B, Beaudet AL, Boricha FM, Whittaker R, Li C, Ware SM, Cheung SW, Penny DJ, Jefferies JL, Belmont JW: Rare DNA copy number variants in cardiovascular malformations with extracardiac abnormalities. *Eur J Hum Genet*, 2013, 21:173–181.
143. Lander J, Ware SM: Copy Number Variation in Congenital Heart Defects. *Curr Genet Med Rep*. 2014, 2:168–178.
144. Lee C, Iafrate AJ, Brothman AR: Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nat Genet*, 2007, 39:S48–54.
145. Lee C, Scherer SW: The clinical context of copy number variation in the human genome. *Expert Rev Mol Med*. 2010, 12:e8.
146. Leung MP, Tang MH, Ghosh A: Prenatal diagnosis of congenital heart malformations: classification based on abnormalities detected by the four-chamber view. *Prenat Diagn*. 1999, 4:305–313.
147. Levy HL, Guldberg P, Güttler F, Hanley WB, Matalon R, Rouse BM, Trefz F, Azen C, Allred EN, de la Cruz F, Koch R: Congenital Heart Disease in Maternal Phenylketonuria: Report from the Maternal PKU Collaborative Study. *Pediatr Res*. 2001, 49:636–642.
148. Lewis TR, Shelton EL, Van Driest SL, Kannankeril PJ, Reese J: Genetics of the patent ductus arteriosus (PDA) and pharmacogenetics of PDA treatment. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2018, 23:232–238.
149. Lillehei CW, Cohen M, Warden HE, Varco RL: The directvision intracardiac correction of congenital anomalies by controlled cross circulation: results in thirty-two patients with ventricular septal defects, tetralogy of Fallot, and atrioventricularis communis defects. *Surgery* 1955, 38:11–29.
150. Liu C, Cao R, Xu Y, Li T, Li F, Chen S, Xu R, Sun K: Rare copy number variants analysis identifies novel candidate genes in heterotaxy syndrome patients with congenital heart defects. *Genome Medicine*. 2018, 10:40.
151. Liu S, Joseph KS, Lisonkova S, Rouleau J, Van den Hof M, Sauve R, Kramer MS: Association Between Maternal Chronic Conditions and Congenital Heart Defects: A Population-Based Cohort Study. *Circulation*. 2013, 128:583–589.
152. Liu S, Liu J, Tang J, Ji J, Chen J, Liu C: Environmental risk factors for congenital heart disease in the Shandong Peninsula, China: a hospital-based case-control study. *J Epidemiol*. 2009, 19:122–130.



153. Liu X, Yagi H, Saeed S, Bais AS, Gabriel GC, Chen Z, Peterson KA, Li Y, Schwartz MC, Reynolds WT, Saydmohammed M, Gibbs B, Wu Y, Devine W, Chatterjee B, Klena NT, Kostka D, de Mesy Bentley KL, Ganapathiraju MK, Dexheimer P, Leatherbury L, Khalifa O, Bhagat A, Zahid M, Pu W, Watkins S, Grossfeld P, Murray SA, Porter GA Jr, Tsang M, Martin LJ, Benson DW, Aronow BJ, Lo CW: The complex genetics of hypoplastic left heart syndrome. *Nature Genet.* 2017, 49:1152–1159.
154. Lu JH, Chung MY, Betau H, Chien HP, Lu JK: Molecular Characterization of Tetralogy of Fallot Within DiGeorge Critical Region of the Chromosome 22. *Pediatric Cardiology.* 2001, 22:279–284.
155. Lupski JR: Genomic rearrangements and sporadic disease. *Nat Genet.* 2007, 39(7 Suppl):S43–47.
156. Maas NM, Van Buggenhout G, Hannes F, Thienpont B, Sanlaville D, Kok K, Midro A, Andrieux J, Anderlid BM, Schoumans J, Hordijk R, Devriendt K, Fryns JP, Vermeesch JR: Genotype-phenotype correlation in 21 patients with Wolf-Hirschhorn syndrome using high resolution array comparative genome hybridisation (CGH). *J Med Genet.* 2008, 45:71–80.
157. MacDonald JR, Robert Ziman R, Ryan K. C. Yuen RKC, Lars Feuk L, Scherer SW: The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome. *Nucleic Acids Research.* 2014, 42, Database issue: D986–D992.
158. Mainardi PC, Perfumo C, Cali A, Coucourde G, Pastore G, Cavani S, Zara F, Overhauser J, Pierluigi M, Bricarelli DF: Clinical and molecular characterisation of 80 patients with 5p deletion: genotype–phenotype correlation. *J Med Genet* 2001, 38:151–158.
159. Man J, Barnett P, Christoffels VM: Structure and function of the Nppa–Nppb cluster locus during heart development and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2018, 75:1435–1444.
160. Manner J: Cardiac looping in the chick embryo: a morphological review with special reference to terminological and biomechanical aspects of the looping process. *Anat Rec.* 2000, 259:248–262.
161. Marelli AJ, Mackie AS, Ionescu-Ittu R, Rahme E, Pilote L: Congenital heart disease in the general population: changing prevalence and age distribution. *Circulation.* 2007, 115:163–172.
162. Marino BS, Lipkin PH, Newburger JW, Peacock G, Gerdes M, Gaynor J, Mussatto KA, Uzark K, Goldberg CS, Johnson WH, Li J, Smith SE, Bellinger DC, Mahle WT: Neurodevelopmental outcomes in children with congenital heart disease: Evaluation and Management: A scientific statement from the American Heart Association. *Circulation.* 2012, 126:1143–1172.

163. Mateja WA, Nelson DB, Kroelinger CD, Ruzek S, Segal J: The association between maternal alcohol use and smoking in early pregnancy and congenital cardiac defects. *J Womens Health Larchmt.* 2012, 21:26–34.
164. Materna–Kirylyuk A, Wisniewska K, Badura–Stronka M, Mejnartowicz J, Wieckowska B, Balcar–Boron A, CzerwionkaSzaflarska M, Gajewska E, Godula–Stuglik U, Krawczynski M, Limon J, Rusin J, Sawulicka–Oleszczuk H, Szwalkiewicz–Warowicka E, Walczak M, Latos–Bielenska A: Parental age as a risk factor for isolated congenital malformations in a Polish population. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2009, 23:2940.
165. McCulley DJ, Black BL: Transcription factor pathways and congenital heart disease. *Curr Top Dev Biol.* 2012, 100:253–277.
166. McDaniel R, Warthen DM, Sanchez–Lara PA, Pai A, Krantz ID, Piccoli DA, Spinner NB: NOTCH2 mutations cause Alagille syndrome, a heterogeneous disorder of the notch signaling pathway. *Am J Hum Genet.* 2006, 79:169–173.
167. McElhinney DB, Geiger E, Blinder J, Benson DW, Goldmuntz E: NKX2.5 mutations in patients with congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2003, 42: 1650–1655.
168. McGowan–Jordan J, Simons A, Schmid M: ISCN 2016: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature. Reprint of: *Cytogenetic and Genome Research* 2016, 149, No. 1–2 by From S. Karger Publishing, Basel, 2016.
169. Meberg A, Hals J, Thaulow E: Congenital heart defects – chromosomal anomalies, syndromes and extracardiac malformations. *Acta Paediatr.* 2007, 96:1142–1145.
170. Meilhac SM, Esner M, Kelly RG, Nicolas JF, Buckingham ME: The clonal origin of myocardial cells in different regions of the embryonic mouse heart. *Dev Cell.* 2004, 6:685–698.
171. Merla G, Brunetti–Pierri N, Piccolo P, Micale L, Loviglio MN: Supravalvular aortic stenosis: elastin arteriopathy. *Circ Cardiovasc Genet.* 2012, 5: 692–696.
172. Merscher S, Funke B, Epstein JA, Heyer J, Puech A, Lu MM, Xavier RJ, Demay MB, Russell RG, Factor S, Tokooya K, Jore BS, Lopez M, Pandita RK, Lia M, Carrion D, Xu H, Schorle H, Kobler JB, Scambler P, Wynshaw-Boris A, Skoultschi AI, Morrow BE, Kucherlapati R: TBX1 is responsible for cardiovascular defects in velo–cardio–facial/DiGeorge syndrome. *Cell.* 2001, 104: 619–629.
173. Metcalfe K, Rucka AK, Smoot L, Hofstadler G, Tuzler G, McKeown P, Siu V, Rauch A, Dean J, Dennis N, Ellis I, Reardon W, Cytrynbaum C, Osborne L, Yates JR, Read AP, Donnai D, Tassabehji M: Elastin: mutational

- spectrum in supra-aortic stenosis. *Eur J Hum Genet*, 2000, 8:955–963.
174. Micale L, Turturo MG, Fusco C, Augello B, Jurado LAP, Izzi C, Digilio MC, Milani D, Lapi E, Zelante L, Merla G: Identification and characterization of seven novel mutations of elastin gene in a cohort of patients affected by supra-aortic stenosis. *Europ. J. Hum. Genet.* 2010, 18:317–323.
  175. Michelena HI, Desjardins VA, Avierinos JF, Russo A, Nkomo VT, Sundt TM, Pellikka PA, Tajik AJ, Enriquez-Sarano M: Natural history of asymptomatic patients with normally functioning or minimally dysfunctional bicuspid aortic valve in the community. *Circulation*. 2008, 117:2776–2784.
  176. Miller A, Riehle-Colarusso T, Siffel C, Frias JL, Correa A: Maternal age and prevalence of isolated congenital heart defects in an urban area of the United States. *Am J Med Genet A*. 2011, 155A:2137–2145.
  177. Moore SW, Fieggen K, Honey E, Zaahl M: Novel Zeb2 gene variation in the Mowat Wilson syndrome (MWS). *Journal of Pediatric Surgery*. 2016, 51:268–271.
  178. Moosmann J, Uebe S, Dittrich S, Ruffer A, Ekici AB, Toka O: Novel Loci for Non-Syndromic Coarctation of the Aorta in Sporadic and Familial Cases. *PLoS One*. 2015, 10:e0126873.
  179. Mordi I, Tzemos N: Bicuspid aortic valve disease: a comprehensive review. *Cardiol Res Pract*. 2012, 2012:196037.
  180. Morris CA, Mervis CB, Paciorkowski AP, Abdul-Rahman O, Dugan SL, Rope AF, Bader P, Hendon LG, Velleman SL, Klein-Tasman BP, Osborne LR1: 7q11.23 Duplication Syndrome: Physical Characteristics and Natural History. *Am J Med Genet A* . 2015, 167A:2916–2935.
  181. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, Das SR, de Ferranti S, Després J-P, Fullerton HJ, Howard VJ, Huffman MD, Isasi CR, Jiménez MC, Judd SE, Kissela BM, Lichtman JH, Lisabeth LD, Liu S, Mackey RH, Magid DJ, McGuire DK, Mohler ER III, Moy CS, Muntner P, Mussolino ME, Nasir K, Neumar RW, Nichol G, Palaniappan L, Pandey DK, Reeves MJ, Rodriguez CJ, Rosamond W, Sorlie PD, Stein J, Towfighi A, Turan TN, Virani SS, Woo D, Yeh RW, Turner MB; on behalf of the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics-2016 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2016, 133:e38–e48.
  182. Munoz-Chapuli R, Perez-Pomares JM: Cardiogenesis: an embryological perspective. *J Cardiovasc Transl Res*. 2010, 3:37–48.

183. Nabulsi MM, Tamim H, Sabbagh M, Obeid MY, Yunis KA, Bitar FF: Parental consanguinity and congenital heart malformations in a developing country. *Am J Med Genet A*. 2003, 116A:342–347.
184. Nagase T, Kikuno R, Ohara O: Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XXI. The complete sequences of 60 new cDNA clones from brain which code for large proteins. *DNA Rec Int J Rapid Publ Rep Genes Genomes*. 2001, 8:179–187.
185. Neill CA, Clark EB: Tetralogy of Fallot. The First 300 Years. *Texas Heart Institute Journal*. 1994, 21:272–279.
186. Nembhard WN, Wang T, Loscalzo ML, Salemi JL: Variation in the prevalence of congenital heart defects by maternal race/ethnicity and infant sex. *J Pediatr*. 2010, 156:259–264.
187. Nimura K, Ura K, Shiratori H, Ikawa M, Okabe M, Schwartz RJ, Kaneda Y: A histone H3 lysine 36 trimethyltransferase links Nk2–5 to Wolf-Hirschhorn syndrome. *Nature*. 2009, 460:287–291.
188. Nora JJ: Multifactorial Inheritance Hypothesis for the Etiology of Congenital Heart Diseases. The Genetic–Environmental Interaction. *Circulation*. 1968, XXXVIII.
189. Noseda M, Peterkin T, Simões FC, Patient R, Schneider MD: Cardiopoietic factors: extracellular signals for cardiac lineage commitment. *Circ. Res*. 2011, 108:129–152.
190. Ou Z, Berg JS, Yonath H, Enciso VB, Miller DT, Picker J, Lenzi T, Keegan Ce, Sutton VR, Belmont J, Chinault AC, Lupski JR, Cheung SW, Roeder E, Patel A: Microduplications of 22q11.2 are frequently inherited and are associated with variable phenotypes. *Genet Med*. 2008, 10:267–277.
191. Øyen N, Diaz LJ, Leirgul E, Boyd HA, Priest J, Mathiesen ER, Quertermous T, Wohlfahrt J, Melbye M: Prepregnancy Diabetes and Offspring Risk of Congenital Heart Disease: A Nationwide Cohort Study. *Circulation*. 2016, 133:2243–2253.
192. Øyen N, Poulsen G, Boyd HA, Wohlfahrt J, Jensen PKA, Melbye M: National time trends in congenital heart defects, Denmark, 1977–2005. *Am Heart J*. 2009a, 157:467–473.
193. Øyen N, Poulsen G, Boyd HA, Wohlfahrt J, Jensen PKA, Melbye M: Recurrence of congenital heart defects in families. *Circulation*. 2009b, 120:295–301.
194. Øyen N, Poulsen G, Wohlfahrt J, Boyd HA, Jensen PKA, Melbye M: Recurrence of discordant congenital heart defects in families. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010, 3:122–128.
195. Park C, Lavine K, Mishina Y, Deng C-X, D, Ornitz DM, Choi K: Bone morphogenetic protein receptor 1A signaling is dispensable for

- hematopoietic development but essential for vessel and atrioventricular endocardial cushion formation. *Development*. 2006, 133: 3473–3484.
196. Patel SS, Burns TL: Nongenetic risk factors and congenital heart defects. *Pediatr Cardiol*. 2013, 34:1535–1555.
197. Peyvandi S, Ingall E, Woyciechowski S, Garbarini J, Mitchell LE, Goldmuntz E: Risk of congenital heart disease in relatives of probands with conotruncal cardiac defects: An evaluation of 1,620 families. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2014, 164: 1490–1495.
198. Pierpont ME, Basson CT, Benson DW, Gelb BD, Giglia TM, Goldmuntz E, McGee G, Sable CA, Srivastava D, Webb CL: Genetic basis for congenital heart defects: current knowledge: a scientific statement from the American Heart Association congenital cardiac defects committee, Council on cardiovascular disease in the Young: endorsed by the American Academy of Pediatrics. *Circ*. 2007, 115:3015–3038.
199. Pizzuti A, Sarkozy A, Newton AL, Conti E, Flex E, Digilio MC, Amati F, Gianni D, Tandoi C, Marino B, Crossley M, Dallapiccola B: Mutations of ZFPM2/FOG2 gene in sporadic cases of tetralogy of Fallot. *Hum Mutat*. 2003, 5:372–377.
200. Pober BR: Williams-Beuren syndrome. *N Engl J Med*. 2010, 362:239–252.
201. Pont SJ, Robbins JM, Bird TM, Gibson JB, Cleves MA, Tilford JM, Aitken ME: Congenital malformations among liveborn infants with trisomies 18 and 13. *Am J Med Genet A*. 2006, 140:1749–1756.
202. Preikšaitienė E, Maldžienė Ž, Morkūnienė A, Cimbalistienė L, Rančelis T, Utkus A, Kučinskas V: Identification of genetic causes of congenital neurodevelopmental disorders using genome wide molecular technologies. *Acta Medica Lituanica*. 2016, 23:73–85.
203. Prendiville T, Jay PY, Pu WT: Insights into the genetic structure of congenital heart disease from human and murine studies on monogenic disorders. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014, 4:a013946.
204. Qiao XH, Wang F, Zhang XL, Huang RT, Xue S, Wang J, Qiu XB, Liu XY, Yang YQ: MEF2C loss-of-function mutation contributes to congenital heart defects. *Int J Med Sci*. 2017, 14:1143–1153.
205. Quinonez SC, Hedera P, Barr M, Ackley T, Lam C, Purkayastha A, Glover TW, Innis JW: Maternal intrachromosomal insertional translocation leads to recurrent 1q21.3q23.3 deletion in two siblings. *Am J Med Genet Part A*. 2012, 158A: 2591–601.
206. Ramroop R, Manase G, Lu D, Manase D, Chen S, Kim R, Lee T, Mahle WT, McHugh K, Mitchell M, Tristani-Firouzi M, Wechsler SB, Wilder NS, Zak V, Lafreniere-Roula M, Newburger JW, Gaynor JW, Russell MW, Mital S: Adrenergic receptor genotypes influence postoperative outcomes

- in infants in the Single-Ventricle Reconstruction Trial. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2017, 1545:1703–1710.
207. Ranger AM, Grusby MJ, Hodge MR, Gravalles EM, de la Brousse FC, Hoey T, Mickanin C, Baldwin HS, Glimcher LH: The transcription factor NF-ATc is essential for cardiac valve formation. *Nature.* 1998, 392:186–190.
208. Rauch R, Hofbeck M, Zweier C, Koch A, Zink S, Trautmann U, Hoyer J, Kaulitz R, Singer H, Rauch A: Comprehensive genotype–phenotype analysis in 230 patients with tetralogy of Fallot. *J Med Genet.* 2010, 47:321–331.
209. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, González JR, Gratacòs M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, Hurles ME: Global variation in copy number in the human genome. *Nature.* 2006, 444:444–454.
210. Reller MD, Strickland MJ, Riehle-Colarusso T, Mahle WT, Correa A: Prevalence of congenital heart defects in metropolitan Atlanta, 1998–2005. *J Pediatr.* 2008, 153:807–813.
211. Riccardi VM, Lupski JR: Duplications, deletions, and singlenucleotide variations: the complexity of genetic arithmetic. *Genet Med.* 2013, 15:172–173.
212. Richards AA, Garg V: Genetics of congenital heart disease. *Curr Cardiol Rev.* 2010, 6:91–97.
213. Richards AA, Santos LJ, Nichols HA, Crider BP, Elder FF, Hauser NS, Zinn AR, Garg V: Cryptic chromosomal abnormalities identified in children with congenital heart disease. *Pediatr Res,* 2008, 64:358–363.
214. Roberts KE, McElroy JJ, Wong WP, Yen E, Widlitz A, Barst RJ, Knowles JA, Morse JH: BMPR2 mutations in pulmonary arterial hypertension with congenital heart disease. *Eur Respir J* 2004, 24: 371–374.
215. Robinson SW, Morris CD, Goldmuntz E, Reller MD, Jones MA, Steiner RD, Maslen CL: Missense Mutations in CRELD1 Are Associated with Cardiac Atrioventricular Septal Defects. *Am J Hum Genet.* 2003, 72:1047–1052.
216. Rosenfeld JA, Ballif BC, Torchia BS, Sahoo T, Ravnan JB, Schultz R, Lamb A, Bejjani BA, Shafer LG: Copy number variations associated with

- autism spectrum disorders contribute to a spectrum of neurodevelopmental disorders. *Genet Med.* 2010, 12:694–702.
217. Ruffier M, Kähäri A, Komorowska M, Keenan S, Laird M, Longden I, Proctor G, Searle S, Staines D, Taylor K, Vullo A, Yates A, Zerbino D, Flicek P: Ensembl core software resources: storage and programmatic access for DNA sequence and genome annotation. *Database.* 2017, 1:1–11.
218. Russell MW, Chung WK, Kaltman JR, Miller TA: Advances in the Understanding of the Genetic Determinants of Congenital Heart Disease and Their Impact on Clinical Outcomes. *J Am Heart Assoc.* 2018, 7: e006906.
219. Sadler TW, Langman J: *Langman's medical embryology.* Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. 2012.
220. Salazar M, Consoli F, Villegas V, Caicedo V, Maddaloni V, Daniele P, Caianiello G, Pachón S, Nuñez F, Limongelli G, Pacileo G, Marino B, Bernal JE, De Luca AS and Dallapiccola B: Search of somatic GATA4 and NKX2.5 gene mutations in sporadic septal heart defects. *Eur J Med Genet.* 2011, 54:306–309.
221. Samánek M: Boy:girl ratio in children born with different forms of cardiac malformation: a population-based study. *Pediatr Cardiol.* 1994, 15:53–57.
222. Sanchez-Castro M, Eldjouzi H, Charpentier E, Busson PF, Hauet Q, Lindenbaum P, Delasalle-Guyomarch B, Baudry A, Pichon O, Pascal C, Lefort B, Bajolle F, Pezard P, Schott JJ, Dina C, Redon R, Gournay V, Bonnet D, Le Caignec C: Search for Rare Copy-Number Variants in Congenital Heart Defects Identifies Novel Candidate Genes and a Potential Role for FOXC1 in Patients With Coarctation of the Aorta. *Circ Cardiovasc Genet.* 2016, 9:86–94.
223. Sarkozy A, Digilio MC, Dallapiccola B: Leopard syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases.* 2008, 3:13.
224. Schleich JM, Abdulla T, Summers R, Houyel L: An overview of cardiac morphogenesis. *Archives of Cardiovascular Disease.* 2013, 106:612–623.
225. Schott JJ, Benson DW, Basson CT, Pease W, Silberbach GM, Moak JP, Maron BJ, Seidman CE, Seidman JG: Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5. *Science.* 1998, 281:108–111.
226. Schulthesis TM, Xydias S, Lassar AB: Induction of avian cardiac myogenesis by anterior endoderm. *Development.* 1995, 121:4203–4214.
227. Selamet Tierney ES, Marans Z, Rutkin MB, Chung WK: Variants of the CFC1 gene in patients with laterality defects associated with congenital cardiac disease. *Cardiol Young.* 2007, 17:268–274.

228. Serra–Juhé C, Rodríguez–Santiago B, Cuscó I, Vendrell T, Camats N, Torán N, Pérez–Jurado L: Contribution of Rare Copy Number Variants to Isolated Human Malformations. *PloS One*. 2012, 10:e45530.
229. Shieh JTC, Bittles AH, and Hudgins L: Consanguinity and the Risk of Congenital Heart Disease. *Am J Med Genet A*. 2012, 158A:1236–1241.
230. Showell C, Binder O, Conlon FL: T-box genes in early embryogenesis. *Dev Dyn*. 2004, 229:201–218.
231. Sifrim A, Hitz MP, Wilsdon A, Breckpot J, Al Turki SH, Thienpont B, McRae J, Fitzgerald TW, Singh T, Swaminathan GJ, Prigmore E, Rajan D, Abdul-Khaliq H, Banka S, Bauer UM, Bentham J, Berger F, Bhattacharya S, Bu'Lock F, Canham N, Colgiu IG, Cosgrove C, Cox H, Daehnert I, Daly A, Danesh J, Fryer A, Gewillig M, Hobson E, Hoff K, Homfray T; INTERVAL Study, Kahlert AK, Ketley A, Kramer HH, Lachlan K, Lampe AK, Louw JJ, Manickara AK, Manase D, McCarthy KP, Metcalfe K, Moore C, Newbury-Ecob R, Omer SO, Ouwehand WH, Park SM, Parker MJ, Pickardt T, Pollard MO, Robert L, Roberts DJ, Sambrook J, Setchfield K, Stiller B, Thornborough C, Toka O, Watkins H, Williams D, Wright M, Mital S, Daubeney PE, Keavney B, Goodship J; UK10K Consortium, Abu-Sulaiman RM, Klaassen S, Wright CF, Firth HV, Barrett JC, Devriendt K, FitzPatrick DR, Brook JD; Deciphering Developmental Disorders Study, Hurles ME.: Distinct genetic architectures for syndromic and nonsyndromic congenital heart defects identified by exome sequencing. *Nature Genetics*. 2016, 48:1060–1065.
232. Silversides CK, Lionel AC, Costain G, Merico D, Migita O, Liu B, Yuen T, Rickaby J, Thiruvahindrapuram B, Marshall CR, Scherer SW, Bassett AS: Rare copy number variations in adults with tetralogy of Fallot implicate novel risk gene pathways. *PLoS Genet*. 2012, 8:e1002843.
233. Smith KA, Joziase IC, Chocron S, van Dinther M, Guryev V, Verhoeven MC, Rehmann H, van der Smagt JJ, Doevendans PA, Cuppen E, Mulder BJ, Ten Dijke P, Bakkers J: Dominant-negative ALK2 allele associates with congenital heart defects. *Circulation*. 2009, 119: 3062–3069.
234. Smith KA, Joziase IC, Chocron S, van Dinther M, Guryev V, Verhoeven MC, Rehmann H, van der Smagt JJ, Doevendans PA, Cuppen E, Mulder BJ, Ten Dijke P, Bakkers J: Dominant-negative ALK2 allele associates with congenital heart defects. *Circulation*. 2009, 119:3062–3069.
235. Soemedi R, Wilson IJ, Bentham J, Darlay R, Topf A, Zelenika D, Cosgrove C, Setchfield K, Thornborough C, Granados–Riveron J, Blue GM, Breckpot J, Hellens S, Zwolinski S, Glen E, Mamasoula C, Rahman TJ, Hall D, Rauch A, Devriendt K, Gewillig M, O'Sullivan J, Winlaw DS, Bu'Lock F, Brook JD, Bhattacharya S, Lathrop M, Santibanez-Koref M,



- Cordell HJ, Goodship JA, Keavney BD: Contribution of global rare copy-number variants to the risk of sporadic congenital heart disease. *Am J Hum Genet.* 2012, 91:489–501.
236. South ST, Whitby H, Battaglia A, Carey JC, Brothman AR: Comprehensive analysis of Wolf-Hirschhorn syndrome using array CGH indicates a high prevalence of translocations. *European Journal of Human Genetics.* 2008, 16:45–52.
237. Southard AE, Edelmann LJ, Gelb BD: Role of Copy Number Variants in Structural Birth Defects. *Pediatrics.* 2012, 129:755–63.
238. Sperling S, Grimm CH, Dunkel I, Mebus S, Sperling HP, Ebner A, Galli R, Lehrach H, Fusch C, Berger F, Hammer S: Identification and functional analysis of CITED2 mutations in patients with congenital heart defects. *Hum. Mutat.* 2005, 26: 575–582.
239. Srivastava D: Building a heart: implications for congenital heart disease. *J Nucl Cardiol.* 2003, 10:63–70.
240. Stallmeyer B, Fenge H, Nowak-Gottl U, Schulze-Bahr E: Mutational spectrum in the cardiac transcription factor gene NKX2.5 (CSX) associated with congenital heart disease. *Clin. Genet.* 2010, 78: 533–540.
241. Stankiewicz P, Lupski JR: Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annu Rev Med.* 2010, 61:437–455.
242. Stewart DR, Kleefstra T: The chromosome 9q subtelomere deletion syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2007, 145C:383–392.
243. Stoll C, Dott B, Alembik Y, Roth MP: Associated congenital anomalies among cases with Down syndrome. *Eur J Med Genet.* 2015, 58:674–680.
244. Szymou A, Tzetzis M, Fryssira H, Kosma K, Oikonomakis V, Giannikou K, Makrythanasis P, Kitsiou-Tzeli S, Kanavakis E: Array comparative genomic hybridization as a clinical diagnostic tool in syndromic and nonsyndromic congenital heart disease. *Pediatr Res.* 2013, 73:772–776.
245. Tararbit K, Houyel L, Bonnet D, De Vigan C, Lelong N, Goffinet F, Khoshnood B: Risk of congenital heart defects associated with assisted reproductive technologies: a population based evaluation. *Eur Heart J.* 2011, 32:500–508.
246. Tartaglia M, Kalidas K, Shaw A, Song X, Musat DL, van der Burgt I, Brunner HG, Bertola DR, Crosby A, Ion A, Kucherlapati RS, Jeffery S, Patton MA, Gelb BD: PTPN11 Mutations in Noonan Syndrome: Molecular Spectrum, Genotype–Phenotype Correlation, and Phenotypic Heterogeneity. *Am J Hum Genet.* 2002, 70:1555–1563.
247. Tarutis V, Lebetkevičius V, Versockas K, Bliūdžiūtė A, Jurgelienė Ž, Umbrasaitė S, Sudikienė R, Liekienė D, Lankutis K, Žilinskas VJ, Sirvydis

- V: Kairiosios širdies hipoplazijos sindromo pirmo chirurginio gydymo etapo pradinė patirtis. *Lietuvos chirurgija*. 2007, 5:448–451.
248. Tatton-Brown K, Douglas J, Coleman K, Baujat G, Cole TR, Das S, Horn D, Hughes HE, Temple IK, Faravelli F, Waggoner D, Turkmen S, Cormier-Daire V, Irrthum A, Rahman N; Childhood Overgrowth Collaboration: Genotype-Phenotype Associations in Sotos Syndrome: An Analysis of 266 Individuals with NSD1 Aberrations. *Am J Hum Genet*. 2005, 77:193–204.
249. Tessari A, Pietrobon M, Notte A, Cifelli G, Gage PJ, Schneider MD, Lembo G, Campione M: Myocardial *pitx2* differentially regulates the left atrial identity and ventricular asymmetric remodeling programs. *Circ Res*. 2008, 102:813–822.
250. Thienpont B, Mertens L, de Ravel T, Eyskens B, Boshoff D, Maas N, Fryns JP, Gewillig M, Vermeesch JR, Devriendt K: Submicroscopic chromosomal imbalances detected by array-CGH are a frequent cause of congenital heart defects in selected patients. *Eur Heart J*. 2007; 28:2778–2784.
251. Tomita-Mitchell A, Mahnke DK, Struble CA, Tuffnell ME, Stamm KD, Hidestrand M, Harris SE, Goetsch MA, Simpson PM, Bick DP, Broeckel U, Pelech AN, Tweddell JS, Mitchell ME: Human gene copy number spectra analysis in congenital heart malformations. *Physiol Genomics*. 2012, 44:518–541.
252. Tyner C, Barber GP, Casper J, Clawson H, Diekhans M, Eisenhart C, Fischer CM, Gibson D, Gonzalez JN, Guruvadoo L, Haeussler M, Heitner S, Hinrichs AS, Karolchik D, Lee BT, Lee CM, Nejad P, Raney BJ, Rosenbloom KR, Speir ML, Villarreal C, Vivian J, Zweig AS, Haussler D, Kuhn RM, Kent WJ: The UCSC Genome Browser database: 2017 update. *Nucleic Acids Research*. 2017, 45:D626–D634.
253. Tzetis M, Kitsiou-Tzeli S, Frysira H, Xaidara A, Kanavakis E: The clinical utility of molecular karyotyping using high-resolution array-comparative genomic hybridization. *Expert Rev Mol Diagn*. 2012, 12:449–457.
254. Uddin M, Pellecchia G, Thiruvahindrapuram B, D'Abate L, Merico D, Chan A, Zarrei M, Tammimies K, Walker S, Gazzellone MJ, Nalpathamkalam T, Yuen RK, Devriendt K, Mathonnet G, Lemyre E, Nizard S, Shago M, Joseph-George AM, Noor A, Carter MT, Yoon G, Kannu P, Tihy F, Thorland EC, Marshall CR, Buchanan JA, Speevak M, Stavropoulos DJ, Scherer SW: Indexing Effects of Copy Number Variation on Genes Involved in Developmental Delay. *Scientific Reports*. 2016, 6:28663.

255. Unolt M, Putotto C, Silvestri LM, Marino D, Scarabotti A, Valerio Massaccesi, Caiaro A, Versacci P, Marino B: Transposition of great arteries: new insights into the pathogenesis. *Front Pediatr.* 2013, 1:11.
256. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG: Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012, 40:e115.
257. Urnikyte A, Domarkiene I, Stoma S, Ambrozaityte L, Uktveryte I, Meskiene R, Kasiulevičius V, Burokiene N, Kučinskis V: CNV analysis in the Lithuanian population. *BMC Genetics*, 2016, 17:64.
258. van Bon BW, Balciuniene J, Fruhman G, Nagamani SC, Broome DL, Cameron E, Martinet D, Roulet E, Jacquemont S, Beckmann JS, Irons M, Potocki L, Lee B, Cheung SW, Patel A, Bellini M, Selicorni A, Ciccone R, Silengo M, Vetro A, Knoers NV, de Leeuw N, Pfundt R, Wolf B, Jira P, Aradhya S, Stankiewicz P, Brunner HG, Zuffardi O, Selleck SB, Lupski JR, de Vries BB: The phenotype of recurrent 10q22q23 deletions and duplications. *European Journal of Human Genetics: EJHG.* 2011, 19:400–408.
259. van der Bom T, Zomer AC, Zwinderman AH, Meijboom FJ, Bouma BJ, Mulder BJ: The changing epidemiology of congenital heart disease. *Nat Rev Cardiol.* 2011, 8:50–60.
260. van der Linde D, Konings EE, Slager MA, Witsenburg M, Helbing WA, Takkenberg JJ, Roos-Hesselink JW: Birth prevalence of congenital heart disease worldwide: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol.* 2011, 58:2241–2247.
261. van Engelen K, Postma AV, van de Meerakker JB, Roos-Hesselink JW, Helderma-van den Enden AT, Vliegen HW, Rahman T, Baars MJ, Sels JW, Bauer U, Pickardt T, Sperling SR, Moorman AF, Keavney B, Goodship J, Klaassen S, Mulder BJ: Ebstein's anomaly may be caused by mutations in the sarcomere protein gene MYH7. *Neth Heart J.* 2013, 21:113–117.
262. van Gelder MM, Roeleveld N, Nordeng H: Exposure to nonsteroidal antiinflammatory drugs during pregnancy and the risk of selected birth defects: a prospective cohort study. *PLoS One.* 2011, 6:e22174.
263. Van Laarhoven PM, Neitzel LR, Quintana AM, Geiger EA, Zackai EH, Clouthier DE, Artinger KB, Ming JE, Shaikh TH: Kabuki syndrome genes KMT2D and KDM6A: functional analyses demonstrate critical roles in craniofacial, heart and brain development. *Human Molecular Genetics.* 2015, 24:4443–4453.
264. Vanlerberghe C, Petit F, Malan V, Vincent-Delorme C, Bouquillon S, Boute O, Holder-Espinasse M, Delobel B, Duban B, Vallee L, Cuisset JM,

- Lemaitre MP, Vantyghem MC, Pigeyre M, Lanco-Dosen S, Plessis G, Gerard M, Decamp M, Mathieu M, Morin G, Jedraszak G, Bilan F, Gilbert-Dussardier B, Fauvert D, Roume J, Cormier-Daire V, Caumes R, Puechberty J, Genevieve D, Sarda P, Pinson L, Blanchet P, Lemeur N, Sheth F, Manouvrier-Hanu S, Andrieux J: 15q11.2 microdeletion (BP1–BP2) and developmental delay, behaviour issues, epilepsy and congenital heart disease: A series of 52 patients. *Eu J Med Genet.* 2015, 58:140–147.
265. Vermeesch JR, Melotte C, Froyen G, Van Vooren S, Dutta B, Maas N, Vermeulen S, Menten B, Speleman F, De Moor B, Van Hummelen P, Marynen P, Fryns JP, Devriendt K: Molecular karyotyping: Array CGH quality criteria for constitutional genetic diagnosis. *J Histochem Cytochem.* 2005, 53:413–422.
266. Vincent SD, Buckingham ME: How to make a heart: the origin and regulation of cardiac progenitor cells. *Curr Top Dev Biol.* 2010, 90:1–41.
267. Völkl TM, Degenhardt K, Koch A, Simm D, Dörr HG, Singer H: Cardiovascular anomalies in children and young adults with Ullrich-Turner syndrome the Erlangen experience. *Clin Cardiol.* 2005, 28:88–92.
268. Walsh T, McClellan JM, McCarthy SE, Addington AM, Pierce SB, Cooper GM, Nord AS, Kusenda M, Malhotra D, Bhandari A, Stray SM, Rippey CF, Roccanova P, Makarov V, Lakshmi B, Findling RL, Sikich L, Stromberg T, Merriman B, Gogtay N, Butler P, Eckstrand K, Noory L, Gochman P, Long R, Chen Z, Davis S, Baker C, Eichler EE, Meltzer PS, Nelson SF, Singleton AB, Lee MK, Rapoport JL, King MC, Sebat J: Rare structural variants disrupt multiple genes in neurodevelopmental pathways in schizophrenia. *Science.* 2008; 320:539–543.
269. Wang J, Xin Y–F, Liu X–Y, Liu Z–M, Wang X–Z, Yang Y–Q: A novel NKX2–5 mutation in familial ventricular septal defect. *Int. J. Mol. Med.* 2011, 27: 369–375.
270. Wang K, Li M, Hadley D, Liu R, Glessner J, Grant SF, Hakonarson H, Bucan M: PennCNV: an integrated hidden Markov model designed for high-resolution copy number variation detection in whole-genome SNP genotyping data. *Genome Res.* 2007, 17:1665–1674.
271. Warburton D, Ronemus M, Kline J, Jobanputra V, Williams I, Anyane-Yeboah K, Chung W, Yu L, Wong N, Awad D, Yu CY, Leotta A, Kendall J, Yamrom B, Lee YH, Wigler M, Levy D: The contribution of de novo and rare inherited copy number changes to congenital heart disease in an unselected sample of children with conotruncal defects or hypoplastic left heart disease. *Hum Genet.* 2014, 133:11–27.
272. Warden HC. Walton Lillehei: pioneer cardiac surgeon. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1989, 98:833–845.

273. Wessels MW, Willems PJ: Genetic factors in non-syndromic congenital heart malformations. *Clin Genet.* 2010, 78:103–123.
274. White MC: Anaesthetic implications of congenital heart disease for children undergoing non-cardiac surgery. *Anaesthesia&Intensive Care Medicine.* 2009, 10:504–509.
275. Wichman CL, Moore KM, Lang TR, St Sauver JL, Heise RH Jr, Watson WJ: Congenital heart disease associated with selective serotonin reuptake inhibitor use during pregnancy. *Mayo Clin Proc.* 2009, 84:23–27.
276. Willemsen MH, Vulto-van Silfhout AT, Nillesen WM, Wissink-Lindhout WM, van Bokhoven H, Philip N, Berry-Kravis EM, Kini U, van Ravenswaaij-Arts CM, Delle Chiaie B, Innes AM, Houge G, Kosonen T, Cremer K, Fannemel M, Stray-Pedersen A, Reardon W, Ignatius J, Lachlan K, Mircher C, Helderma van den Enden PT, Mastebroek M, Cohn-Hokke PE, Yntema HG, Drunat S, Kleefstra T.: Update on Kleefstra Syndrome. *Mol Syndromol.* 2011, 2:202–212.
277. Wu X, Li R, Fu F, Pan M, Han J, Yang X, Zhang Y, Li F, Liao C: Chromosome microarray analysis in the investigation of children with congenital heart disease. *BMC Pediatrics.* 2017, 17:117.
278. Wurst KE, Poole C, Ephross SA, Olshan AF: First trimester paroxetine use and the prevalence of congenital, specifically cardiac, defects: a meta-analysis of epidemiological studies. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2010, 88:159–170.
279. Xie HM, Werner P, Stambolian D, Bailey-Wilson JE, Hakonarson H, White PS, Taylor DM, Goldmuntz E: Rare copy number variants in patients with congenital conotruncal heart defects. *Birth Defects Res.* 2017, 109:271–295.
280. Xu H, Morishima M, Wylie JN, Schwartz RJ, Bruneau BG, Lindsay EA, Baldini A: *Tbx1* has a dual role in the morphogenesis of the cardiac outflow tract. *Development.* 2004, 131:3217–3227.
281. Yagi H, Furutani Y, Hamada H: Role of *TBX1* in human del22q11.2 syndrome. *Lancet.* 2003, 362:1366–1373.
282. Yang YQ, Li L, Wang J, Liu XY, Chen XZ, Zhang W, Wang XZ, Jiangm JQ, Liu X, Fang WY: A novel *GATA4* loss-of-function mutation associated with congenital ventricular septal defect. *Pediatr. Cardiol.* 2012, 33:539–546.
283. Yaoita M, Niihori T, Mizuno S, Okamoto N, Hayashi S, Watanabe A, Yokozawa M, Suzumura H, Nakahara A, Nakano Y, Hokosaki T, Ohmori A, Sawada H, Migita O, Mima A, Lapunzina P, Santos-Simarro F, García-Miñaur S, Ogata T, Kawame H, Kurosawa K, Ohashi H, Inoue S, Matsubara Y, Kure S, Aoki Y: Spectrum of mutations and genotype–

- phenotype analysis in Noonan syndrome patients with RIT1 mutations. *Hum Genet.* 2016, 135:209–222.
284. Ye M, Coldren Ch, Liang X, Mattina T, Goldmuntz E, Benson DW, Ivy D, Perryman MB, Garrett–Sinha LA, Grossfeld P: Deletion of ETS-1, a gene in the Jacobsen syndromecritical region, causes ventricular septal defects and abnormal ventricular morphology in mice. *Human Molecular Genetics.* 2010, 19:648–656.
285. Yoshimura K, Kitagawa H, Fujiki R, Tanabe M, Takezawa S, Takada I, Yamaoka I, Yonezawa M, Kondo T, Furutani Y, Yagi H, Yoshinaga S, Masuda T, Fukuda T, Yamamoto Y, Ebihara K, Li DY, Matsuoka R, Takeuchi JK, Matsumoto T, Kato S: Distinct function of 2 chromatin remodeling complexes that share a common subunit, williams syndrome transcription factor (WSTF). *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009, 106: 9280–9285.
286. Yunis K, Mumtaz G, Bitar F, Chamseddine F, Kassar M, Rashkidi J, Makhoul G, Tamim H: Consanguineous marriage and congenital heart defects: a case-control study in the neonatal period. *Am J Med Genet A.* 2006, 140:1524–1530.
287. Yunis K, Mumtaz G, Bitar F, Chamseddine F, Kassar M, Rashkidi J, Makhoul G, Tamim H: Consanguineous marriage and congenital heart defects: a case–control study in the neonatal period. *Am J Med Genet A.* 2006, 140:1524–1530.
288. Zaffran S, Frasch M: Early signals in cardiac development. *Circ.Res.* 2002, 91:457–469.
289. Zaidi S, Choi M, Wakimoto H, Ma L, Jiang J, Overton JD, Romano-Adesman A, Bjornson RD, Breitbart RE, Brown KK, Carriero NJ, Cheung YH, Deanfield J, DePalma S, Fakhro KA, Glessner J, Hakonarson H, Italia MJ, Kaltman JR, Kaski J, Kim R, Kline JK, Lee T, Leipzig J, Lopez A, Mane SM, Mitchell LE, Newburger JW, Parfenov M, Pe'er I, Porter G, Roberts AE, Sachidanandam R, Sanders SJ, Seiden HS, State MW, Subramanian S, Tikhonova IR, Wang W, Warburton D, White PS, Williams IA, Zhao H, Seidman JG, Brueckner M, Chung WK, Gelb BD, Goldmuntz E, Seidman CE, Lifton RP: De novo mutations in histone-modifying genes in congenital heart disease. *Nature.* 2013, 498:220–223.
290. Zaragoza MV, Fung L, Jensen E, Oh F, Cung K, McCarthy LA, Tran CK, Hoang V, Hakim SA, Grosberg A: Exome Sequencing Identifies a Novel LMNA Splice–Site Mutation and Multigenic Heterozygosity of Potential Modifiers in a Family with Sick Sinus Syndrome, Dilated Cardiomyopathy, and Sudden Cardiac Death. *PLoS One.* 2016, 11: e0155421.

291. Zhang F, Carvalho CMB, Lupski JR: Complex human chromosomal and genomic rearrangements. *Trends Genet.* 2009, 25:298–307.
292. Zhang F, Gu W, Hurles ME, Lupski JR: Copy number variation in human health, disease, and evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2009, 10:451–481.
293. Zhao W, Niu G, Shen B, Zheng Y, Gong F, Wang X, Lee J, Mulvihill JJ, Chen X, Li S: High-resolution analysis of copy number variants in adults with simple-to-moderate congenital heart disease. *Am J Med Genet Part A.* 2013, 161A:3087–3094.
294. Zhu L, Vranckx R, Khau Van Kien P, Lalande A, Boisset N, Mathieu F, Wegman M, Glancy L, Gasc JM, Brunotte F, Bruneval P, Wolf JE, Michel JB, Jeunemaitre X: Mutations in myosin heavy chain 11 cause a syndrome associating thoracic aortic aneurysm/aortic dissection and patent ductus arteriosus. *Nature Genetics.* 2006, 38:343–349.
295. Zomerdijk IM, Ruiters R, Houweling LM, Herings RM, Sturkenboom MC, Straus SM, Stricker BH: Isotretinoin exposure during pregnancy: a population-based study in The Netherlands. *BMJ Open.* 2014, 4:e005602.
296. Zweier M, Gregor A, Zweier C, Engels H, Sticht H, Wohlleber E, Bijlsma EK, Holder SE, Zenker M, Rossier E, Grasshoff U, Johnson DS, Robertson L, Firth HV; Cornelia Kraus, Ekici AB, Reis A, Rauch A: Mutations in MEF2C from the 5q14.3q15 microdeletion syndrome region are a frequent cause of severe mental retardation and diminish MECP2 and CDKL5 expression. *Hum Mutat.* 2010, 31:722–733.

Internetiniai šaltiniai:

1. ClinGen. <https://www.clinicalgenome.org/>
2. ClinGen Dosage Sensitivity Map. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/dbvar/clingen/>
3. Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources database (Decipher). <https://decipher.sanger.ac.uk/>
4. Database of Genomic Variants. A curated catalogue of human genomic structural variation (DGV). <http://projects.tcag.ca/variation/>
5. Ensembl genome browser 91. <https://www.ensembl.org/>
6. European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations (ECARUCA). [www.ecaruca.net](http://www.ecaruca.net)
7. Gimimų medicininiai duomenys 2016/Medical data of Births 2016. Higienos instituto Sveikatos informacijos centras. <http://www.hi.lt/medical-data-of-births/>
8. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). <https://www.omim.org/>

9. Tarptautinės statistinės ligų ir sveikatos sutrikimų klasifikacijos 10-asis pataisytas ir papildytas leidimas Australijos modifikacija (TLK–10–AM). <http://ebook.vlk.lt/e.vadovas/>
10. UCSC Genome Browser. <https://genome.ucsc.edu/>
11. R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.



## PRIEDAI

1 priedas. Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto leidimas atlikti biomedicininį tyrimą



### VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETAS

Viešoji įstaiga, Universiteto g. 3, LT-01513 Vilnius, tel. (8 5) 268 7001, faks. (8 5) 272 8646, el. p. [info@er.vu.lt](mailto:info@er.vu.lt).

Duomenys kaupiami ir saugomi Juridinių asmenų registre, kodas 211950810.

Fakulteto duomenys: M.K. Čiurlionio g. 21/27, LT-03101 Vilnius, tel. (8 5) 239 8701, (8 5) 239 7800, faks. (8 5) 239 8705, el. p. [mf@mf.vu.lt](mailto:mf@mf.vu.lt)

### VILNIAUS REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS

M.K. Čiurlionio g. 21/27, LT-03101 Vilnius, tel. (8 5) 268 6998, el. p. [rbtek@mf.vu.lt](mailto:rbtek@mf.vu.lt)

## LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININIŲ TYRIMĄ

2015-04-07 Nr.158200-15-782-296

Tyrimo pavadinimas:

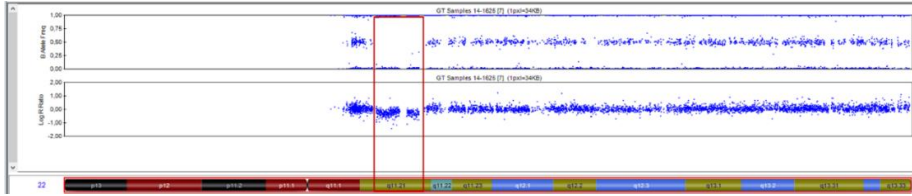
**Genominių veiksmų analizė ir reikšmė įgimtų širdies ydų etiopatogenezeje**

Protokolo Nr.:	1
Versija:	2
Data:	2015-03-27
Asmens informavimo ir informuoto asmens sutikimo forma:	Tėvams/Globėjams
Versija:	2
Data:	2015-03-27
Asmens informavimo ir informuoto asmens sutikimo forma:	Suaugusiems tiriamiesiems
Versija:	2
Data:	2015-03-27
Asmens informavimo ir informuoto asmens sutikimo forma:	7-9 metų vaikams
Versija:	1
Data:	2015-03-02
Asmens informavimo ir informuoto asmens sutikimo forma:	10-12 metų vaikams
Versija:	1
Data:	2015-03-02
Asmens informavimo ir informuoto asmens sutikimo forma:	13-15 metų vaikams
Versija:	1
Data:	2015-03-02
Asmens informavimo ir informuoto asmens sutikimo forma:	16-17 metų vaikams
Versija:	1
Data:	2015-03-02
Pagrindiniai tyrėjai:	<b>Algirdas Utkus</b>
Įstaigos pavadinimas:	Vilniaus Universiteto Ligoninės Santariškių klinikos Medicininės Genetikos centras
Adresas:	Santariškių g. 2, LT-08406, Vilnius
Įstaigos pavadinimas:	Vilniaus Universitetas Medicinos fakultetas Žmogaus ir medicininės genetikos katedra
Adresas:	Santariškių g. 2, LT-08406, Vilnius
Leidimas galioja iki:	2017-09-31

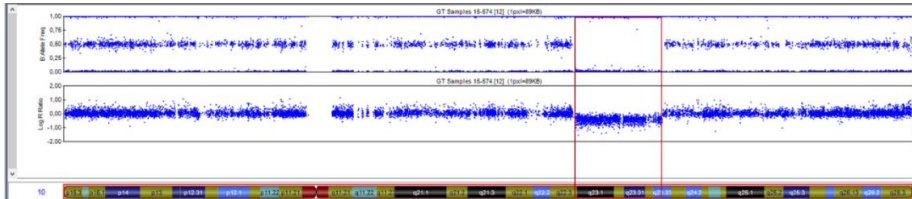
2 priedas. Įgimtos širdies ydos, nustatytos tiriamosios grupės tiriamiesiems

<b>ĮŠY morfologinės grupės</b>	<b>Kardiologinių fenotipų pogrupiai</b>	<b>Tiriamiesiems nustatytos ĮŠY</b>
<b>ĮŠY su normaliomis širdies segmentinėmis jungtimis</b>	Pertvarų defektai	Prieširdžių pertvaros defektas, skilvelių pertvaros defektas
	Atrioventrikulinės pertvaros defektai	Atrioventrikulinė komunikacija, atrioventrikulinė komunikacija su tetrada Fallot
	Atrioventrikulinių vožtuvų anomalijos	Mitralinio vožtuvo nesandarumas, triburio vožtuvo nesandarumas
	Arterijų vožtuvų anomalijos/ išvaymo traktų obstrukcijos	Plaučių arterijos stenozė, plaučių arterijos vožtuvo stenozė, plaučių arterijos atrezija, plaučių arterijos vožtuvo atrezija, triburio vožtuvo nesandarumas, aortos vožtuvo atrezija, aortos vožtuvo nesandarumas, dviburis aortos vožtuvas
	Tetrada Fallot	Tetrada Fallot, atrioventrikulinė komunikacija su tetrada Fallot
<b>ĮŠY su nenormaliomis širdies segmentinėmis jungtimis</b>	Funkcinė vieno skilvelio širdis	Kairiosios širdies pusės hipoplazijos sindromas, triburio vožtuvo atrezija, kairiojo skilvelio hipoplazija, dešiniojo skilvelio hipoplazija, dvigubas įtekėjimas į kairįjį skilvelį, aortos vožtuvo atrezija
	Stambiųjų kraujagyslių transpozicija	Stambiųjų kraujagyslių transpozicija
	Dvigubas ištekėjimas iš skilvelio	Dvigubas ištekėjimas iš dešinio skilvelio
	Bendras arterinis kamienas	Bendras arterinis kamienas
<b>Stambiųjų kraujagyslių anomalijos</b>		Atviras arterinis latakas, aortos displazija, kylančiosios dalies aortos išsiplėtimas, nusileidžiančiosios dalies aortos susiaurėjimas, aortos koarktacija, viršvožtuvinė aortos stenozė
<b>Širdies padėties anomalijos</b>		Dekstrokardija

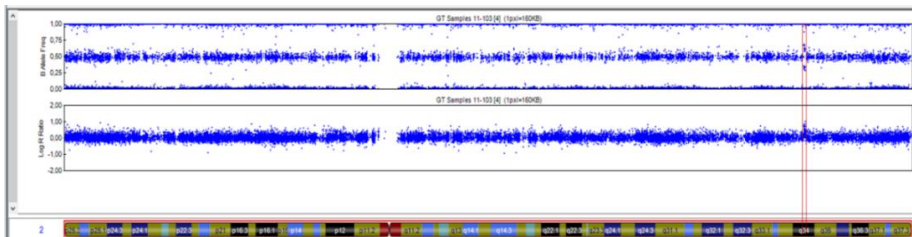
### 3 priedas. Patogeniniai KSP, nustatyti tiriamiesiems, turintiems IŠY



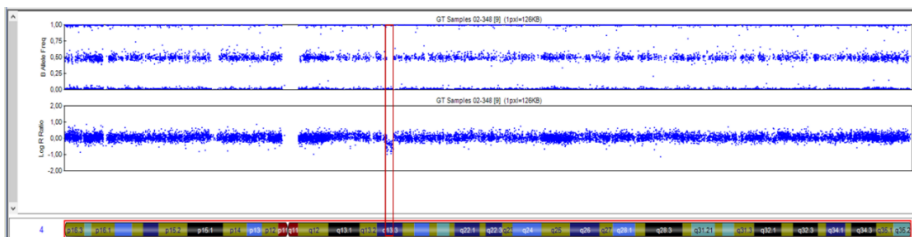
CG-007. Delecija 22q11.21



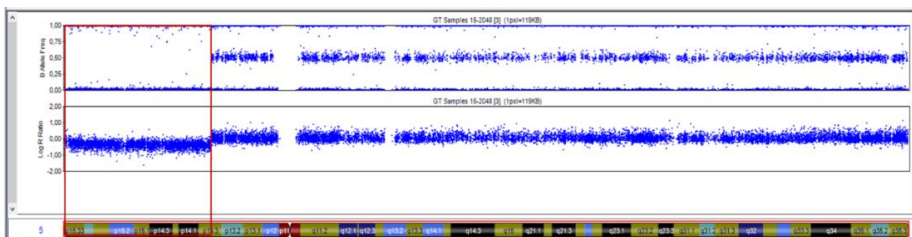
CG-010. Delecija 10q22.3q23.33



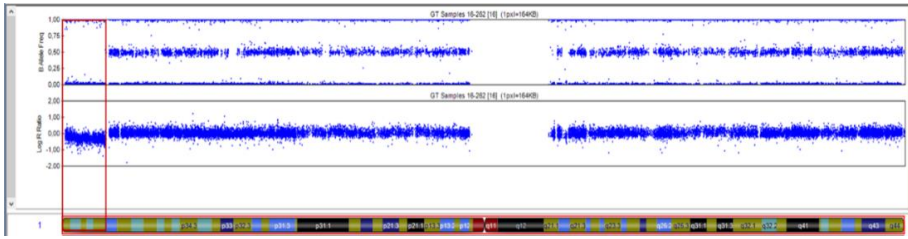
CG-017. Duplikacija 2q34



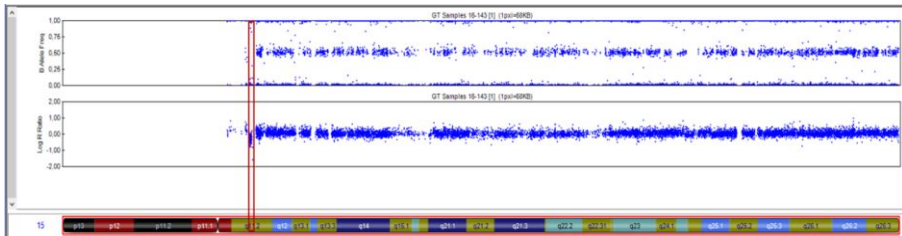
CG-018. Delecija 4q13.3



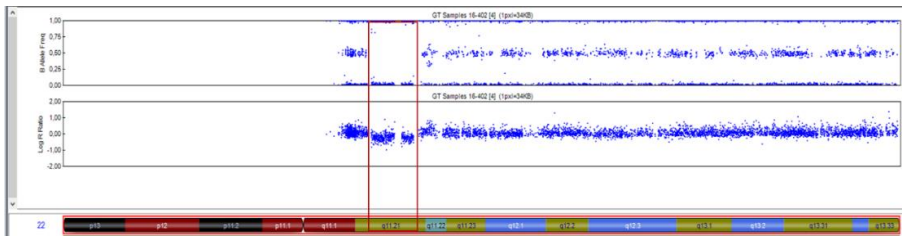
CG-019. Delecija 5q15.33q13.3



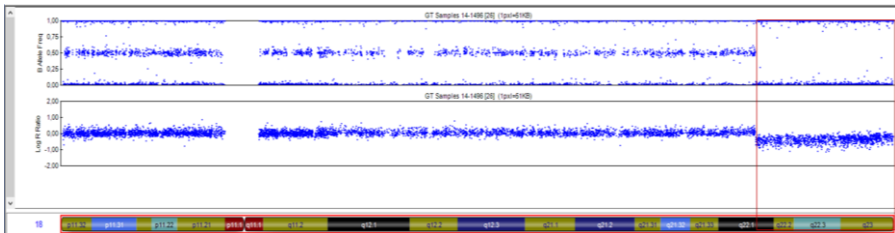
CG-037. Delecija 1p36.22p36.32



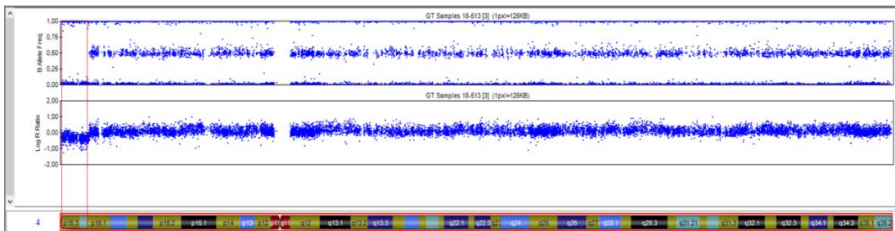
CG-039. Delecija 15q11.2



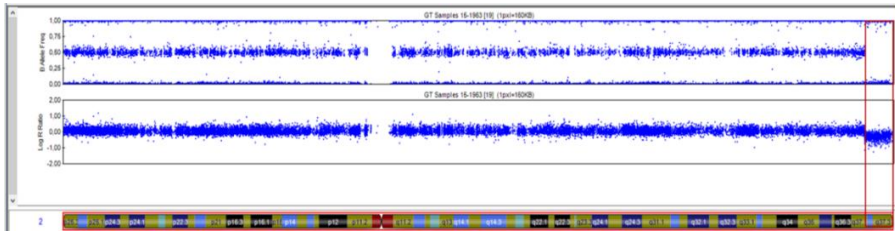
CG-040. Delecija 22q11.21



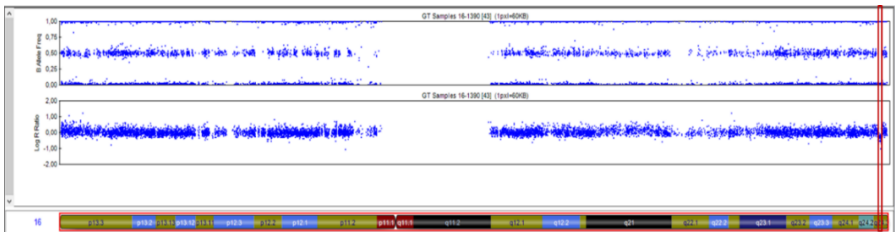
CG-044. Delecija 18q22.1q23



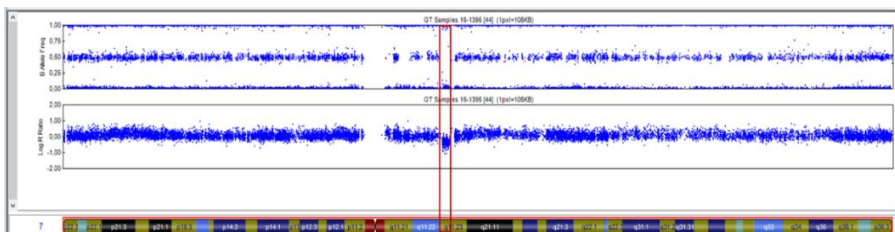
CG-051. Delecija 4p16.3p16.1



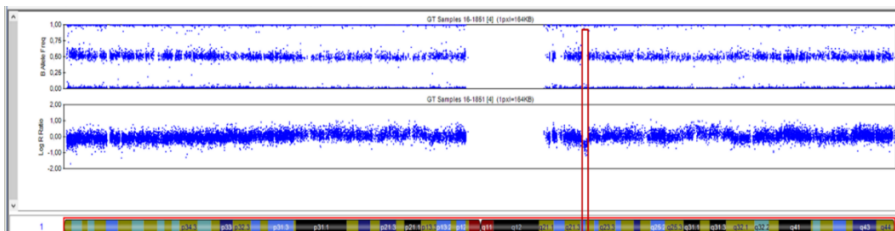
CG-052. Delecija 2q37.1q37.3



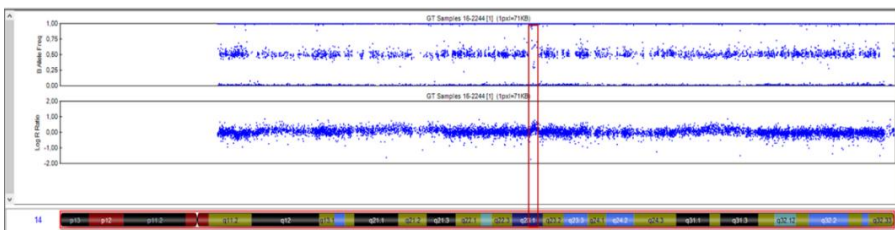
CG-061. Delecija 16q24.3



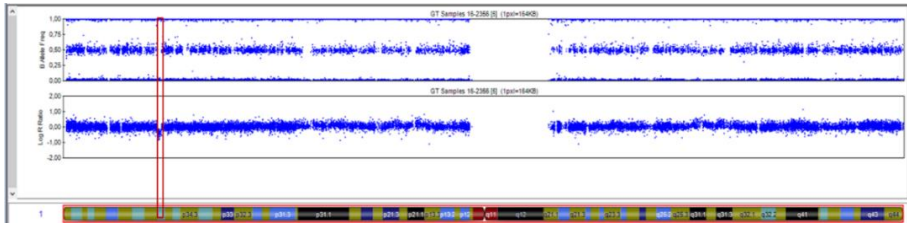
CG-062. Delecija 7q11.23



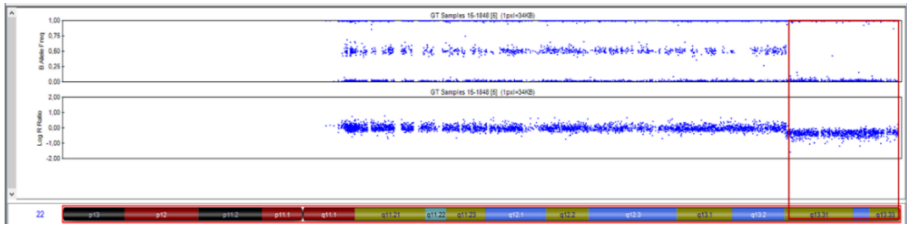
CG-067. Delecija 1q22q23.1



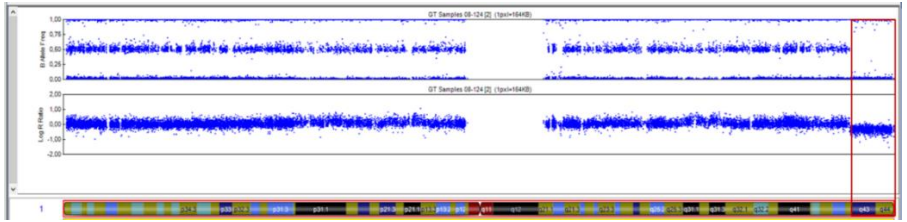
CG-070. Duplikacija 14q23.1



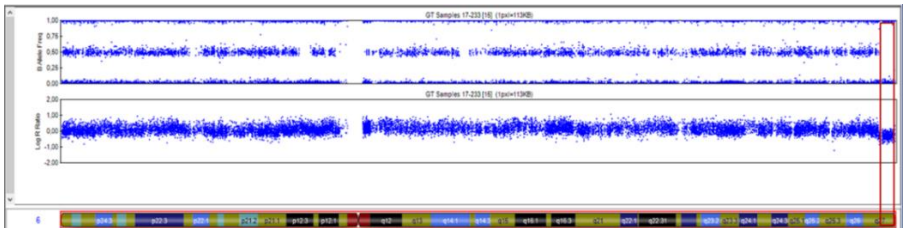
CG-072. Delecija 1p36.11p35.3



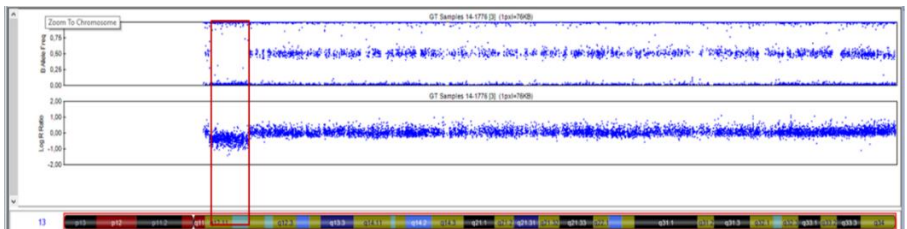
CG-074. Delecija 22q13.31q13.33



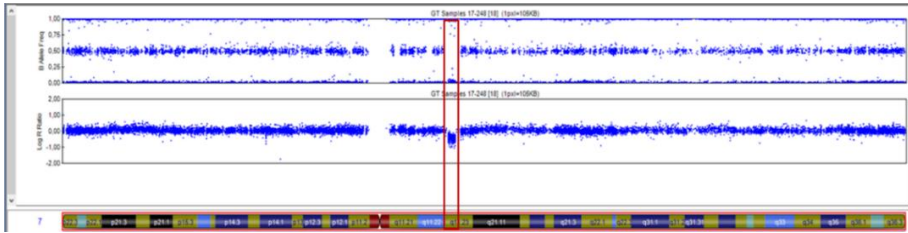
CG-084. Delecija 1q42.3q44



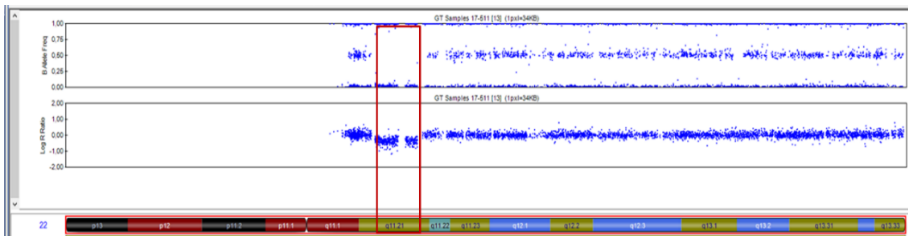
CG-089. Delecija 6q27



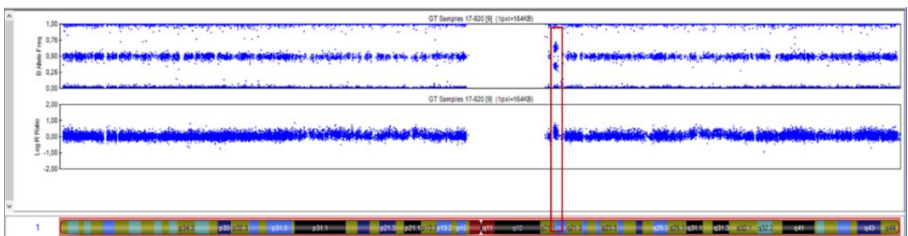
CG-090. Delecija 13q12.11q12.12



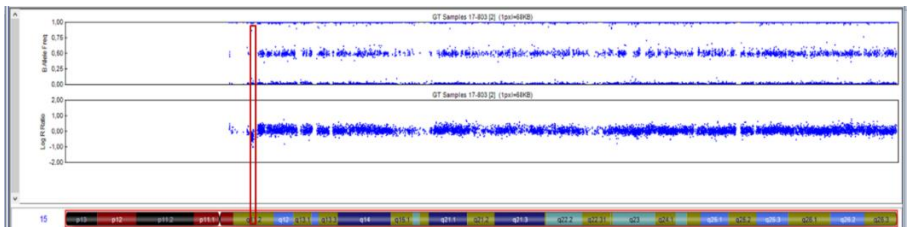
CG-092. Delecija 7q11.23



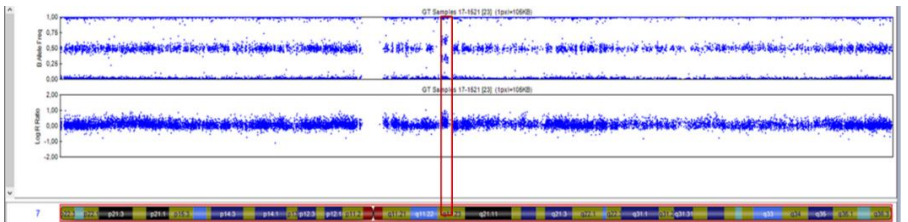
CG-093. Delecija 22q11.21



CG-097. Duplikacija 1q21.1q21.2

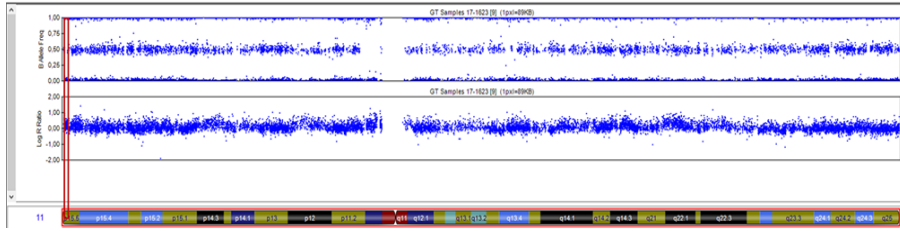


CG-099. Delecija 15q11.2

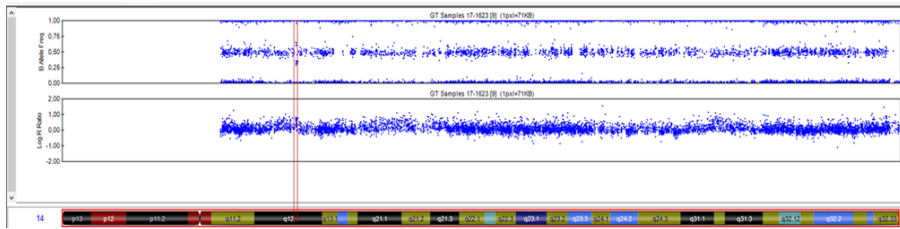


CG-107. Duplikacija 7q11.23

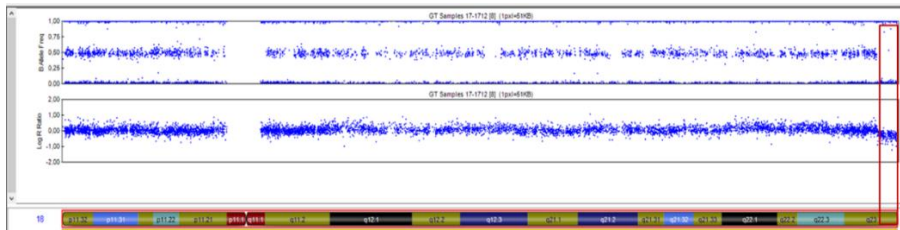
a)



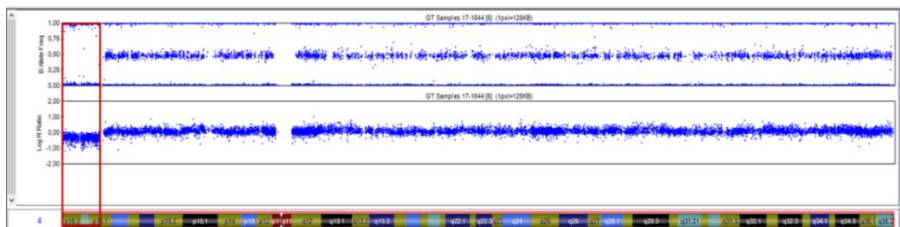
b)



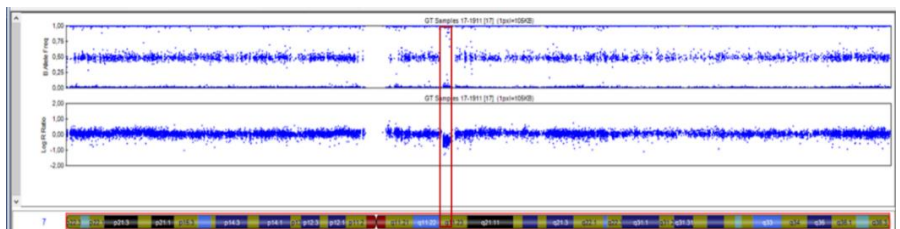
CG-109. Duplikacija 11p15.5 (a) ir duplikacija 14q12 (b)



CG-112. Delecija 18q23

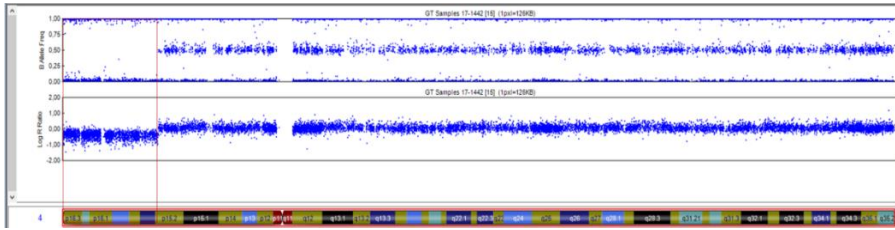


CG-113. Delecija 4p16.3p16.1

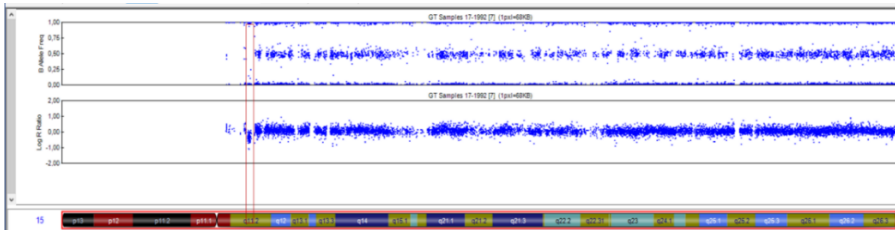


CG-116. Delecija 7q11.22q11.23

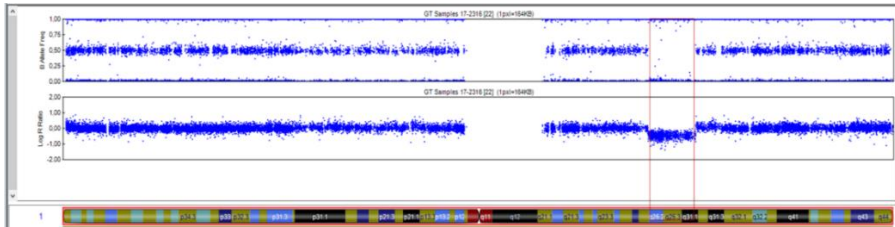




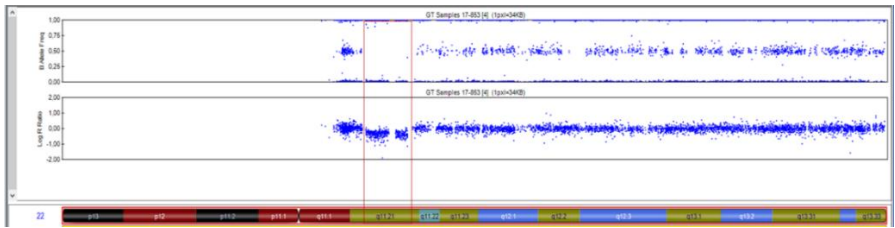
CG-117. Delecija 4p16.3p15.2



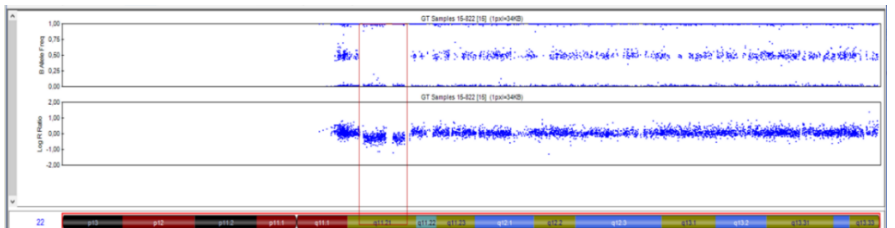
CG-118. Delecija 15q11.2



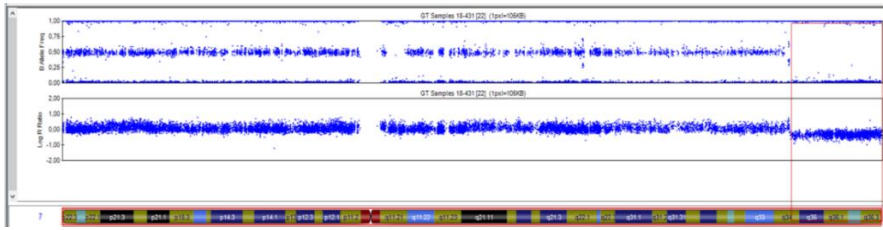
CG-120. Delecija 1q25.1q31.1



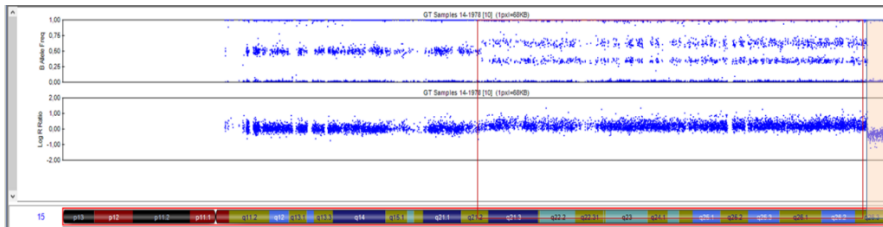
CG-124. Delecija 22q11.21



CG-126. Delecija 22q11.21

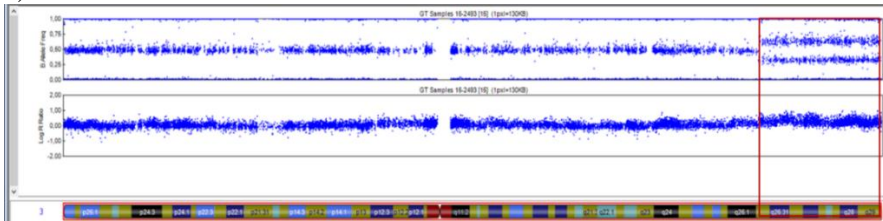


CG-132. Delecija 7q34q36.3

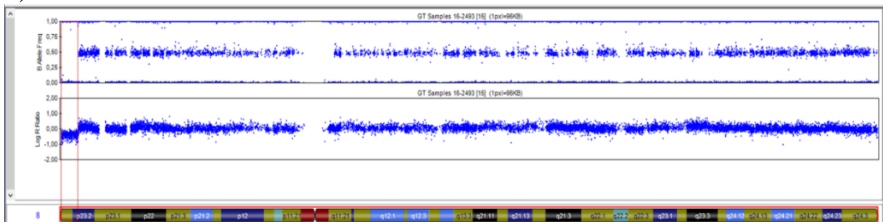


CG-008. Duplikacija 15q21.2q26.3 ir delecija 15q26.3 (pažymėta oranžine spalva)

a)

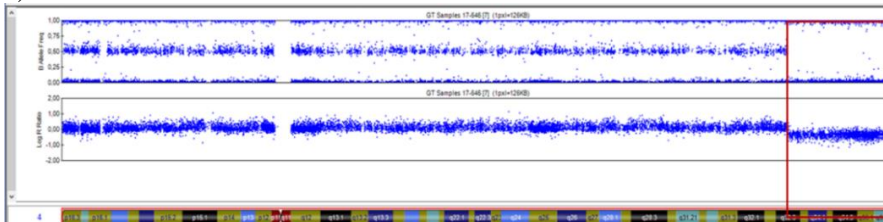


b)

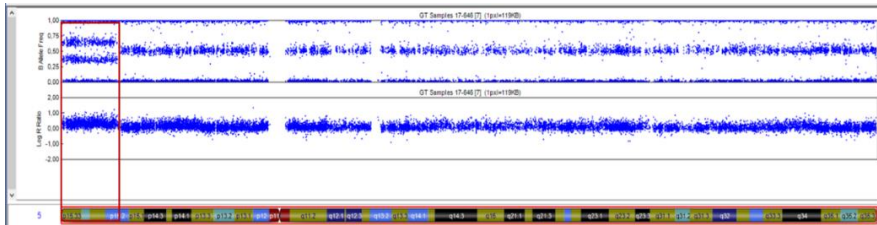


CG-078. Duplikacija 3q26.2q29 (a) ir delecija 8p23.3p23.2 (b)

a)

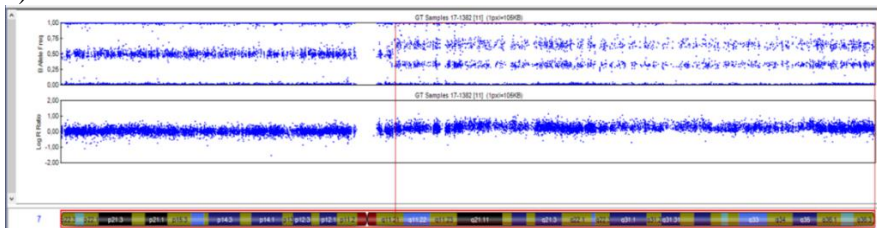


b)

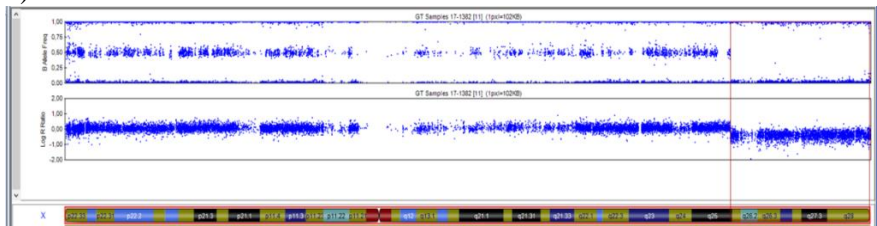


CG-085. Delecija 4q32.3q35.2 (a) ir duplikacija 5p15.33p15.2 (b)

a)

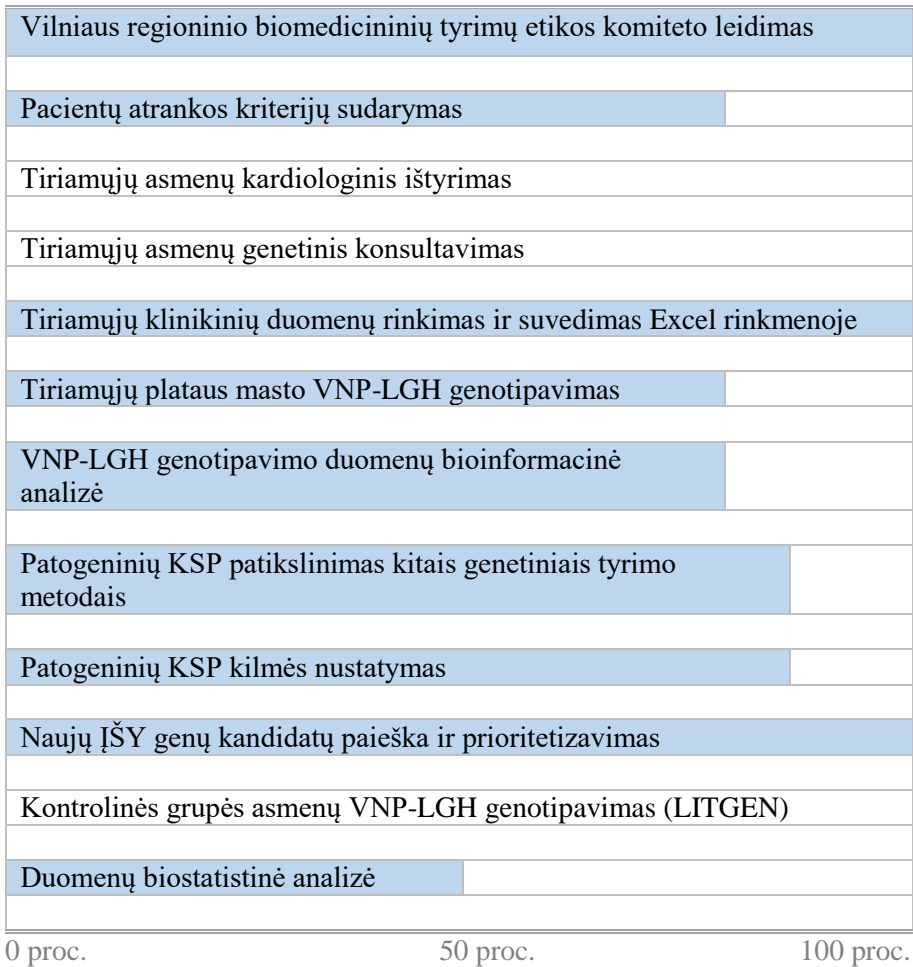


b)



CG-106. Duplikacija 7q11.21q36.3 (a) ir delecija Xq25q28 (b)

4 priedas. Mokslinio darbo vykdymo etapai (autorės indėlis pažymėtas mėlyna spalva).



## PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju VU Medicinos fakulteto Biomedicininų tyrimų instituto Žmogaus ir medicininės genetikos katedros vadovui, šio darbo moksliniam konsultantui prof. dr. Algirdui Utkui už suteiktą galimybę atlikti šį mokslinį darbą ir vertingą pagalbą.

Nuoširdžiai dėkoju šio darbo mokslinei vadovei prof. dr. Loretai Cimbalistienei už vertingą pagalbą mokslinio darbo rengimo metu ir nuolatinį palaikymą.

Padėkos žodžius tariau akademikui profesoriui habil. dr. Vaidučiui Kučinskui – už tai, kad einu genetikos mokslo keliu.

Noriu padėkoti darbą vertinusioms recenzentėms – VU Klinikinės medicinos instituto Širdies ir kraujagyslių ligų klinikos docentei dr. Jūratei Barysieniui ir VU Biomedicininų tyrimų instituto Žmogaus ir medicininės genetikos katedros mokslo darbuotojai dr. Ingridai Domarkienei ir asistentei dr. Agnei Bankauskienei už vertingas pastabas, patobulinusias šį darbą.

Esu dėkinga VU Santaros klinikų Medicininės genetikos centro gydytojoms genetikėms prof. dr. Loretai Cimbalistienei, dr. Aušrai Matulevičienei, Natalijai Krasovskajai, dr. Eglei Preikšaitienei, Evelinai Dageytei, Birutei Burnytei, dr. Birutei Tumieniui ir dr. Violetai Mikštieniui už kolegiską pagalbą sudarant tiriamųjų grupę.

Nuoširdžią padėką skiriu kolegei ir draugei dr. Aušrai Matulevičienei už didelį palaikymą, įkvėpimą ir pagalbą.

Padėkos žodžius tariau VU Santaros klinikų Širdies ir krūtinės chirurgijos centro gydytojams kardiologams Kęstučiui Lankučiuui ir Laimutei Laučiuvienei už pagalbą sudarant tiriamųjų grupę.

Esu dėkinga VU Santaros klinikų Širdies ir krūtinės chirurgijos centro kardiologui prof. dr. Virgilijui Taručiuui už pagalbą stengiantis suprasti kardiologijos mokslą.

Noriu širdingai padėkoti doc. dr. Almai Molytei už vertingą pagalbą atliekant bioinformacinę duomenų analizę.

Nuoširdi padėka VU Santaros klinikų Medicininės genetikos centro Molekulinės genetikos ir citogenetikos laboratorijos kolegoms Evelinai Dageytei, Ritai Laimutei, Liucijai Bikauskaitei-Valčiukei, dr. Ingridai

Domarkienei, dr. Tautvydui Rančeliui, dr. Aušrai Morkūnienei, Kristinai Grigalionienei, dr. Vytautui Šliužui, Jolantai Savickienei, Vilijai Deveikienei, Jovitai Latvytei, Dalytei Pliaugo ir Daivai Regelskienei už pagalbą atliekant genetinius tyrimus ir kasdienį darbą laboratorijoje. Ypatingą ačiū tariau kolegei doc. dr. Laimai Ambrozaitytei už bendrą konstruktyvų darbą, patarimus ir palaikymą.

Esu dėkinga VU Medicinos fakulteto Biomedicininų tyrimų instituto Žmogaus ir medicininės genetikos katedros kolegoms už draugišką darbinę aplinką.

Skiriu nuoširdžią padėką tiriamiesiems ir jų tėvams, sutikusiems dalyvauti šiame tyrime ir leidusiems analizuoti jų klinikinius ir genetinius duomenis.

Už įkvėpimą, supratimą, kantrybę ir rūpestį esu labai dėkinga mano mylimai šeimai – vyrui Vaidotui, dukrai Klaudijai ir sūnui Kristupui, tėveliams Teresai ir Stanislovui.

Už palaikymą ir padrąšinimą padėkos žodžius tariau savo draugams.

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla  
Universiteto g. 1, LT-01513 Vilnius  
El. p. [info@leidykla.vu.lt](mailto:info@leidykla.vu.lt),  
[www.leidykla.vu.lt](http://www.leidykla.vu.lt)  
Tiražas 30 egz.