Klinička, etiološka i genetička obilježja mentalnog zaostajanja kod djece

Tomac, Višnja

Doctoral thesis / Disertacija

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:985278

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Višnja Tomac

KLINIČKA, ETIOLOŠKA I GENETIČKA OBILJEŽJA MENTALNOG ZAOSTAJANJA KOD DJECE

Doktorska disertacija

Osijek, 2021.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Silvija Pušeljić, prim. dr. med.

Komentor rada: izv. prof. dr. sc. Jasenka Wagner Kostadinović

Rad ima 93 stranice.

Sadržaj

Popis kratica III
Popis tablica VI
Popis slika VIII
1. Uvod 1
1.1. Definicija mentalnog zaostajanja 1
1.2. Epidemiologija mentalnog zaostajanja 3
1.3. Etiologija mentalnog zaostajanja 3
1.4. Evaluacija genetičkih uzroka mentalnog zaostajanja 4
2. Genetički uzroci mentalnog zaostajanja 5
2.1. Numeričke kromosmske aberacije 5
2.2. Mikrodelecijski sindromi 7
2.3. Molekularno-citogenetičke i tehnike molekularne genetike u detekciji kromosomskih aberacija 14
2.4. Monogenske bolesti 18
3. Hipoteza 23
4. Ciljevi 24
5. Materijali i metode 25
5.1. Etička načela 25
5.2. Ustroj studije 25
5.3. Ispitanici 26
5.4. Materijali 27
5.4.1. Dijagnostički postupak kod ispitanika s mentalnim zaostajanjem 27
5.4.2. Laboratorijske metode − klasična citogenetika i molekularna genetika 28
5.5. Statističke metode 31
6. Rezultati 32
6.1. Aberacije utvrđene GTG-pruganjem kod ispitanika s mentalnim zaostajanjem 39
6.1.1. Fenotip i genotip ispitanika s numeričkim aberacijama utvrđenim GTG-pruganjem 40
6.1.2. Fenotip i genotip ispitanika sa strukturnim aberacijama utvrđenim GTG-pruganjem 42
6.2. Mikrodelecijski sindromi kod ispitanika s mentalnim zaostajanjem 47
6.3. Čimbenici rizika i obilježja ispitanika s fragilnim X sindromom i Rettovim sindromom 50

6.4. Čimbenici rizika i obilježja ispitanika ispitanika s aberacijama utvrđenim metodom MLPA subtelomera....51
6.5. Čimbenici rizika i obilježja ispitanika s aberacijama utvrđenim metodom komparativne genomske hibridizacije na mikropostroju....51
6.6. Čimbenici rizika i obilježja ispitanika bez utvrđenog genetičkog uzroka mentalnog zaostajanja....52
7. Rasprava....54
8. Zaključak....67
9. Sažetak....68
11. Literatura....70
12. Životopis....89

Popis kratica

aCGH	komparativna genomska hibridizacija na mikropostroju/mikročipovima (prema engl. *Microarray comparative genomic hybridization)*
AD	autosomno dominantno
ADHD	poremećaj s nedostatkom pažnje i hiperaktivnošću (prema engl. *Attention deficit hyperactivity disorder*)
ADMZ	autosomno dominantno mentalno zaostajanje
AR	autosomno recesivno
ARMZ	autosomno recesivno mentalno zaostajanje
AS	Angelmanov sindrom
ASD	atrijski septalni defekt
BAC	sintetiziranih bakterijskih umjetnih kromosoma (prema engl. *Bacterial artificial chromosome*)
BWS	Beckwith-Wiedemannov sindrom
CdCS	Cri du chat sindrom
CMA	molekularna kariotipizacija (prema engl. *Chromosomal microarray*)
CNV	varijacije u broju kopija (prema engl. *Copy number variations*)
CTG	C-pruganje Giemsom i tripsinom
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (prema engl. *deoxyribonucleic acid*)
DORV	dvostruki izlaz krvnih žila iz desne klijetke (prema engl. *Double outlth righ ventricle*)
DS	Downov sindrom
DSM-IV	Dijagnostički i statistički priručnik za duševne poremećaje
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina (prema engl. *Ethylenediaminetetraacetic acid*)
EEG	elektroencefalogram
ES	Edwardsov sindrom

FISH	fluorescentna *in situ* hibridizacija
FRAXA	fragilni X sindrom
GTG	G-pruganje Giemsom i tripsinom
HIV	virus humane imunodeficijencije
HSV ½	herpes simplex virus 1 i 2
HGH	hormon rasta (prema engl. *Human growth hormone*)
HZJZ	Hrvatski zavod za javno zdravstvo
IC	imprinting centar
IGF-1	inzulinu sličan čimbenik rasta (prema engl. *Insulin-like growth factor 1*)
IUGR	intrauterini zastoj u rastu (prema engl. *Intrauterine growth restriction*)
IQ	kvocijent inteligencije (prema engl. *intelligence quotient*)
kb	kilobaza
KBC	klinički bolnički centar
Mb	megabaza
M-FISH	višebojna fluorescentna *in situ* hibridizacija (prema engl. *multicolour-FISH*)
MKB-10	Međunarodna klasifikacija bolesti i srodnih zdravstvenih problema
MLPA	metoda višestrukog umnažanja vezanih sondi (prema engl. *Multiplex ligation-dependent probe amplification*)
MR	magnetska rezonancija
MZ	mentalno zaostajanje
NGS	sekvencioniranje sljedeće generacije (prema engl. *Next genome sequencing*)
OMIM	McKusickov katalog mendelijevskih nasljednih bolesti (prema engl. *Online Mendelian Inheritance in Man*)
pb	parova baza
PCR	lančana reakcija polimerazom (prema engl. *Polymerase chain reaction*)
PS	Patauov sindrom
PWS	Prader-Willijev sindrom

RNA	ribonukleinska kiselina (prema engl. *ribonucleic acid*)
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina (prema engl. *messenger ribonucleic acid*)
SNP	polimorfizam jednog nukleotida (engl. s*ingle nucletode polymorphism*)
SPSS	statistički program za društvene znanosti (prema engl. *Statistical Package for Social Sciences*)
SRS	Silver-Russellov sindrom
SŽS	središnji živčani sustav
UPD	uniparentna disomija
VOUS	varijanta nepoznatog kliničkog značenja (engl. *Variants of uncertain clinical significance*)
VSD	ventrikularni septalni defekt
WES	sekvenciranje cijelog egzoma (engl. *Whole exome sequencing*)
WHS	Wolf-Hirschhornov sindrom
X-MZ	X-vezano mentalno zaostajanje

Popis tablica

Tablica 5.1. Prednosti i nedostatci pojedinih laboratorijskih tehnika.....30

Tablica 6.1. Dob u trenutku postavljanja dijagnoze i spol ispitanika s mentalnim zaostajanjem 32

Tablica 6.2. Nalaz psihologijske i logopedske obrade ispitanika s mentalnim zaostajanjem .33

Tablica 6.3. Čimbenici rizika ispitanika s mentalnim zaostajanjem 33

Tablica 6.4. Dob roditelja u vrijeme rođenja ispitanika s mentalnim zaostajanjem.....33

Tablica 6.5. Ukupan broj pozitivnih nalaza prema korištenim metodama 34

Tablica 6.6. Broj ispitanika s poznatim sindromima utvrđeni GTG-pruganjem i FISH metodom 35

Tablica 6.7. Aberacije kod ispitanika s mentalnim zaostajanjem utvrđenih analizom MLPA subtelomera korištenjem proba P036 i P070 35

Tablica 6.8. Patogene promjene utvrđene metodom komparativne genomske hibridizacije na mikropostroju kod ispitanika s mentalnim zaostajanjem.....36

Tablica 6.9. Varijante nepoznatog kliničkog značenja i benigne promjene utvrđene metodom komparativne genomske hibridizacije na mikropostroju kod ispitanika s mentalnim zaostajanjem 37

Tablica 6.10. Popis gena kandidata povezanih s mentalnim zaostajanjem kod ispitanika s mentalnim zaostajanjem 38

Tablica 6.11. Kromosomski poremećaji utvrđeni kod ispitanika s mentalnim zaostajanje 39

Tablica 6.12. Broj ispitanika po spolu i perinatalni čimbenici ispitanika s Downovim sindromom 40

Tablica 6.13. Komorbiditeti ispitanika s Downovim sindromom 41

Tablica 6.14. Prenatalni čimbenici rizika i obilježja ispitanika s DiGeorgeovim sindromom..47

Tablica 6.15. Prenatalni čimbenici rizika i obilježja ispitanika s Prader Willijevim i Angelmanovim sindromom 48

Tablica 6.16. Prenatalni čimbenici rizika i obilježja ispitanika s Williams-Beurenovim sindromom 48

Tablica 6.17. Prenatalni čimbenici rizika i obilježja ispitanika s Cri du Chat sindromom 49

Tablica 6.18. Prenatalni čimbenici rizika i obilježja ispitanika s Wolf-Hirschhornovim sindromom 50

Tablica 6.19. Broj ispitanika s fragilnim X sindromom i sindromom Rett i nalaz logopeda i psihologa.....50

Tablica 6.20. Prenatalni čimbenici rizika i obilježja ispitanika s aberacijama u subtelomernim regijama korištenjem MLPA metode 51

Tablica 6.21. Prenatalni čimbenici rizika i obilježja ispitanika s patogenim promjenama utvrđenim metodom komparativne genomske hibridizacije na mikropostroju ...52

Tablica 6.22. Čimbenici rizika i komorbiditeti ispitanika s mentalnim zaostajanjem bez utvrđenog genetičkog uzroka.....53

Tablica 6.23. Nalaz logopeda i psihologa ispitanika s mentalnim zaostajanjem bez utvrđenog genetičkog uzroka.....53

Popis slika

Slika 2.1. Primjer normalnog muškog kariograma učinjenog GTG-pruganjem 6

Slika 2.2. Primjer pruganja kromosoma tehnikom CTG-a 7

Slika 2.3. Primjer utiskivanja gena za faktor rasta 2 sličanu inzulinu (*Igf2*).....9

Slika 2.4. Primjer analize kromosoma tehnikom fluorescentne in situ hibridizacije (FISH) ...14

Slika 2.5. Shematski prikaz najčešćih gena na X kromosomu povezanih s X-vezanim mentalnim zaostajanjem 20

Slika 5.1. Hodogram dijagnostičkog postupka kod ispitanika 27

Slika 6.1. Kariogram ispitanika 1 42

Slika 6.2. Kariogram ispitanika 2 43

Slika 6.3. Potvrda kromosomske aberacije FISH metodom kod ispitanika 2. 43

Slika 6.4. Kariogram ispitanika 3 44

Slika 6.5. Kariogram ispitanika 6 45

Slika 6.6. Potvrda kromosomske aberacije FISH metodom kod ispitanika 6 45

1. Uvod

1.1. Definicija mentalnog zaostajanja

Mentalno zaostajanje (MZ) definirano je kao invalidnost koju određuju značajna ograničenja u intelektualnom funkcioniranju i adaptivnom ponašanju koje obuhvaća svakodnevne socijalne i praktične vještine, a započelo je prije 18. godine života. Intelektualno funkcioniranje, koje se naziva i inteligencija, odnosi se na opće mentalne sposobnosti poput učenja, razmišljanja, rješavanja problema i slično. Prilagodljivo ponašanje predstavlja skup konceptualnih (jezik i pismenost), socijalnih (međuljudske vještine, društvena odgovornost) i praktičnih vještina (aktivnosti svakodnevnog života i osobne njege, profesionalne vještine, zdravstvena zaštita) koje ljudi nauče i izvode u svakodnevnom životu (1). Suvremena se psihijatrija u klasifikaciji mentalnog zaostajanja uglavnom koristi Međunarodnom klasifikacijom bolesti i srodnih zdravstvenih problema (MKB-10) (2) te Dijagnostičkim i statističkim priručnikom za duševne poremećaje (DSM-IV) (3). Prema DSM-IV, mentalno zaostajanje označava značajno ispodprosječno intelektualno funkcioniranje praćeno značajnim ograničenjem adaptivnog funkcioniranja s početkom prije 18. godine života. Za primjenjivost definicije važne su sljedeće četiri pretpostavke:

1. ispravna procjena – koja mora uzeti u obzir kulturne i lingvističke različitosti te razlike u komunikaciji i ponašanju;

2. postojanje ograničenja u adaptivnim vještinama – koje se javlja unutar konteksta okruženja i karakteristično je za dobnu skupinu osobe;

3. specifična adaptivna ograničenja – koja često postoje usporedno s uspješnošću u drugim adaptivnim vještinama i sposobnostima;

4. potpora – koja, ako je prisutna, značajno poboljšava funkcioniranje pojedinca s mentalnim zaostajanjem (3).

MKB-10 definira MZ kao stanje zaostalog ili nepotpunog razvoja uma, posebno obilježeno oštećenjem sposobnosti koje se očituju za vrijeme razvoja, sposobnosti koje pridonose cjelokupnu stupnju razvoja inteligencije, primjerice mišljenje, govor, motorika, te sposobnosti ostvarivanja društvenog kontakta. Intelektualne sposobnosti i socijalna prilagodba mijenjaju se tijekom djetetova razvoja. Razvoj može imati neprekidan tijek, a mogu se evidentirati i stupnjevite promjene. Termin razvojno zaostajanje obično se rabi u kontekstu dobi malog djeteta (pet godina) jer u tom se razdoblju inteligencija ne može formalno ispitati

pa se sa sigurnošću ne može postaviti dijagnoza MZ-a (2). Zaostajanje u razvoju nije vezano samo za razdoblje malog djeteta i termin se ne koristi samo u toj dobi. Početak je najčešće u dobi malog djeteta, ali zaostajanje u razvoju se kao termin koristi u svim razvojnim dobima. Razvojne encefalopatije u načelu obilježava rana manifestacija, ali isto tako se početak razvojnog zaostajanja dakle zaostajanja u kognitivnim, ali i motoričkom i psihičkom može očitovati i poslije te dobi – to su razvojne encefalopatije s kasnim početkom. Genetički uzroci su npr. mutacije gena *SCN2A, KCNQ2* i *STXBP1* (4). Termin razvojna encefalopatija uključuje zaostajanje u razvoju ili oštećenje kognitivnih funkcija (intelektualno zaostajanje) i očituje se kao statičko neprogresivno zaostajanje, iako stupanj intelektualnog poremećaja može postati uočljiv kasnije u dobi djeteta, adolescenta ili odrasle osobe. Genetički uzroci razvojnih poremećaja imaju značajan rizik za epilepsije (5).

Test kvocijenta inteligencije (prema engl. *intelligence quotient,* IQ) glavni je alat za mjerenje intelektualnog funkcioniranja, a to je mentalna sposobnost za učenje, rasuđivanje, rješavanje problema i dr. (1). Dobiva se primjenom jednog ili više standardiziranih individualno primijenjenih testova inteligencije, npr. Revidirane Wechslerove ljestvice inteligencije za djecu (prema engl. *Wechsler Intelligence Scale for Children-Revised*), Stanford-Binetova testa, Kaufmanove baterije za procjenu inteligencije i dr. Rezultat testa ispod ili oko 70 ili najviše 75 upućuje na ograničenje u intelektualnom funkcioniranju. Prema DSM-IV, MZ se dijeli na sljedeće subkategorije prema IQ testu: blago (IQ 50 – 55 do 70), umjereno (IQ 35 – 49 do 50 – 55), teško (IQ 25 – 20 do 35 – 40), duboko (IQ ispod 20) (3). Prema MKB-10, MZ se dijeli na: lako (IQ 50 – 69), umjereno (IQ 35 – 49), teško (IQ 20 – 34) i duboko (IQ ispod 20) (2). Između kriterija MKB-10 i DSM-IV postoji razlika u determiniranosti dobi, kada je riječ o MZ-u, koju DSM-IV definira prije osamnaeste godine, dok MKB-10 tu dob ne definira. Razlike su i u definiranju subkategorija MZ-a. MKB-10 navodi samo jednu vrijednost IQ-a, a DSM-IV definira raspon s razlikom od 5, primjerice 50 – 55 prema DSM-IV, a 50 prema MKB-10. Kao razlog uporabe tog raspona navodi se mogućnost pogreške unutar raspona. Pri procjeni treba uz kliničku sliku voditi računa i o ukupnom dojmu u snalaženju i komunikaciji koju mentalno zaostala osoba u određenom trenutku prezentira. Ako se utvrdi nerazmjer između brojčane vrijednosti IQ-a i ukupnog kliničkog dojma, opredjeljuje se za blaži stupanj MZ-a, posebice u slučaju mlađe osobe. U kliničkoj su slici dosta česte razlike između pojedinih subkategorija MZ-a što upućuje na činjenicu da su ostali klinički simptomi dobrim dijelom determinirani kvocijentom inteligencije osobe. Važno je od

MZ-a zaostajanja razlikovati neke druge psihičke probleme ili pedagoške smetnje koje bitno utječu na daljnji djetetov razvoj (2, 3).

1.2. Epidemiologija mentalnog zaostajanja

Poznato je da je MZ heterogene etiologije. Prevalencija MZ-a značajno varira zbog različitih kriterija i metoda primijenjenih u dijagnozi. Na prevalenciju mogu utjecati socijalni, ekonomski, kulturni, rasni, etnički i drugi čimbenici, uključujući dob i spol. Taj je problem prisutan u 2 – 3 % dječje populacije, posebice zato što 5 – 10 % djece ima oštećenje motorike, izolirano kašnjenje govora i jezika, teški primaran senzorički deficit. Mentalno je zaostajanje učestalije u zemljama nižeg socioekonomskog statusa zbog povećane učestalosti anoksije, porođajnih trauma i infekcija mozga novorođenčeta (6, 7, 8). Smatra se da je prevalencija MZ-a u razvijenim zemljama 1 – 3 % (9). U studiji koju su proveli Sharma i suradnici (10) prevalencija MZ-a iznosi 1,71 % među djecom u sjevernoj Indiji, a sličan je udio zapažen i u ostalim studijama (11, 12). Demografske analize vrlo su važne u procjeni prevalencije mentalnog zaostajanja: godine, spol, socioekonomsko stanje, gradska ili seoska sredina i dr. (13). Islam i suradnici (14) u svojem su radu u kojem su istražili sociodemografske čimbenike rizika za MZ pokazali da se izolirano MZ rijetko javlja kod djece s višim socioekonomskim statusom, osim ako dijete nije pretrpjelo određeno oštećenje, te da je izolirano mentalno zaostajanje povezano sa socioekonomskim stanjem obitelji. Ako se usporede ruralna i urbana područja, veća je učestalost MZ-a u ruralnom području u odnosu na urbano (15). Kada je riječ o spolu, veća je zastupljenost MZ-a među muškom djecom (16, 17) što se može pripisati većim brojem X-MZ-a. Mentalna je zaostalost zastupljena među djecom u starijoj dobnoj skupini u odnosu na mlađe dobne skupine (10, 19), a razlog takvom trendu mogao bi se pripisati poteškoćama u dijagnostici MZ-a u ranoj dobi. Prevalencija blagog MZ-a češće ovisi o vanjskim okolišnim čimbenicima (razina obrazovanja roditelja, pristup obrazovanju, mogućnost i pristup zdravstvenoj skrbi), dok je prevalencija teškog MZ-a relativno stabilna (20).

1.3. Etiologija mentalnog zaostajanja

Etiologija MZ-a ima heterogene okolinske i genetičke uzroke. Prenatalni su čimbenici: okolišni čimbenici (infekcija majke u trudnoći – rubeola, sifilis, toksoplazmoza, citomegalovirus i HIV infekcija; bolesti majke (dijabetes, hipertenzija, hipotireoza); teratogeni čimbenici – upotreba lijekova kao što su antiepileptici (fenitoin, valproati), varfarin natrij, talidomid, retinoidi, tetraciklini, metotreksat; alkohol, zračenje; numeričke kromosomske aberacije, primjerice trisomija 21, kriptične kromosomske aberacije – delecije ili duplikacije te

genske mutacije; metabolički uzroci kao što su fenilketonurija, hipotireoza, galaktozemija, glikogenoze, mitohondrijske bolesti (Leigh encefalopatija, MEGDEL sindrom), peroksisomne bolesti. Perinatalni su čimbenici prijevremeni porod, niska porođajna težina i asfiksija. Postnatalni su čimbenici: sepsa, meningitis, encefalitis (obično uzrokovan HSV 1/2) i različiti višečimbenični uzroci (siromaštvo i kulturni čimbenici) (21, 22). Smatra se da su genetički uzroci MZ-a zastupljeni u udjelu oko 25 – 50 % (23). Procjenjuje se da su genetički uzroci zastupljeni u umjerenom i teškom MZ-u (IQ <50) u 0,3 – 0,5 % (IQ <50), u 1 – 3 % u lakom MZ-u (IQ u rasponu od 50 do 70) i u 25 – 50 % u dubokom MZ-u (24). Važnost genetičkih čimbenika u nastanku MZ-a vidljiva je iz činjenice da su gotovo sve kromosomske aberacije praćene razvojnim zaostajanjem. McKusickov katalog mendelski nasljednih bolesti (prema engl. *Online Mendelian Inheritance in Man,* OMIM) citira više od 2000 monogenskih poremećaja praćenih MZ-om (25).

1.4. Evaluacija genetičkih uzroka mentalnog zaostajanja

Više studija je nastojalo utvrditi u kojem dijelu osoba s MZ-om možemo otkriti kromosomski poremećaj primjenom metoda standardne kariotipizacije. Rezultati su različiti, u rasponu od 4 – 34 % (26, 27). Tome su razlog veličina uzorka, različit odabir bolesnika, kao i razlike u primjeni citogenetičkih tehnika. Citogenetičke aberacije su najvažniji uzrok MZ-a koji je dostupan dijagnozi (27). Najčešće je riječ o Downovom sindromu (DS), koji ima oko 9 % svih osoba s MZ-om, a rjeđe o drugim numeričkim ili strukturnim kromosomskim poremećajima koje nalazimo u oko 3 – 4 % slučaja (28). Stoga je kod svake osobe s MZ-om čak i u odsutnosti jasne dismorfije standardni postupak kariotipizacija na razini rezolucije od najmanje 550 pruga (29). Fluorescentna*in situ* hibridizacija (FISH) je već niz godina prva metoda u dijagnostici poznatih mikrodelecijskih sindroma. Mikrodelecijski sindromi najčešći su uzrok MZ-a nakon strukturnih kromosomskih poremećaja vidljivih standardnom kariotipizacijom, pa ih nalazimo u 1,3 – 4,7 % osoba s MZ-om, ovisno o tome tko je postavio indikaciju za ispitivanje, jer je za točnu dijagnozu potrebno kliničko iskustvo u prepoznavanju kliničke slike. Pretpostavlja se da je ukupan udio poznatih mikrodelecijskih sindroma u skupini bolesnika s MZ-om 5,3 % (28). Danas je u uporabi veći broj metoda probira cijelog genoma, a cilj je postići što bolje razlučivanje uz što manje tehničkih poteškoća. Komparativna genomska hibridizacija (prema engl. *Comparative Genome Hybridization,* CGH) koristi hibridizaciju na metafazne kromosome na pokrovnom stakalcu kako bi se pregledao cijeli genom u jednom postupku s rezolucijom > 5 − 10 milijuna parova baza (Mb) (30). Rabi se kao metoda probira cijelog genoma, premda njena moć razlučivanja nije bitno bolja od kariotipizacije visoke

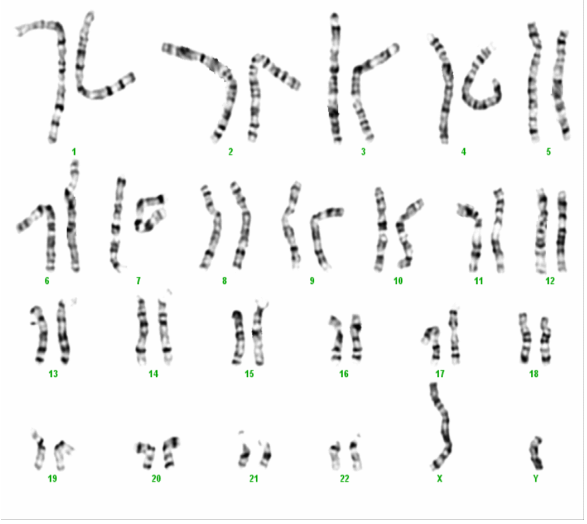
rezolucije. Najnovije metode analize submikroskopskih poremećaja zamijenile su metafazne kromosome komadićima deoksiribonukleinske kiseline (DNA) na silikonskim ili staklenim matricama – komparativna genomska hibridizacija na mikropostroju (prema engl. *Array Comparative Genomic Hybridizationarray*, aCGH). Metodu primjenjujemo u ispitivanju naoko balansiranih kromosomskih aberacija s kliničkim manifestacijama te u ispitivanju osoba normalnog kariotipa kod kojih nalazimo MZ, dismorfične crte, i/ili kongenitalne malformacije (31). Rutinsko ispitivanje neselekcioniranih osoba s MZ-om urednog kariotipa otkrit će ovom metodom oko 12 % abnormalnosti kromosoma, pretežno delecija, smještenih u intersticiju (32). aCGH je dobra metoda za rutinsku analizu osoba s MZ-om, no nedostatak joj je što ne otkriva balansirane translokacije, kriptične mozaične oblike, kao niti dio mikrodelecijskih sindroma kod kojih su delecije ispod razine rezolucije ove tehnike. S obzirom da metoda aCGH detektira intragenske delecije i atipične delecije kod mikrodelecijskih sindroma, kada je klinički fenotip nespecifičan i neupadan, bolje je rabiti aCGH kao metodu probira kojim će se otkriti nečekivana mikrodelecija. Kromosomski poremećaji otkrivaju se u oko 29 % osoba s MZ-om. Od toga je oko polovice vidljivo standardnim citogenetičkim metodama ako se primjenjuju metode pruganja visoke rezolucije, dok je druga polovica vidljiva na molekularnoj razini. Stoga je danas aCGH metoda izbora u dijagnostici MZ-a.

2. Genetički uzroci mentalnog zaostajanja

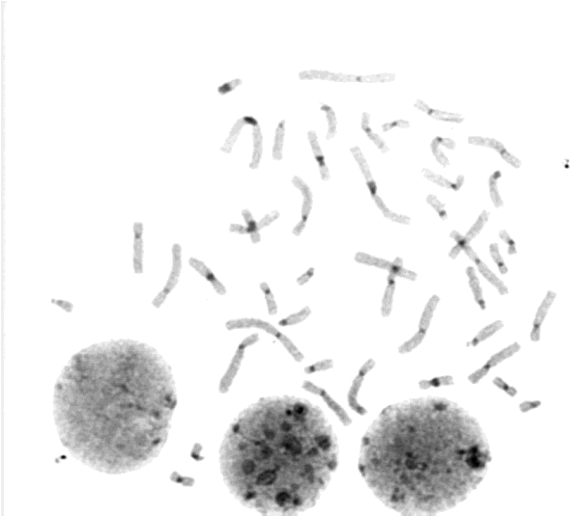
2.1. Numeričke kromosmske aberacije

Temelji humane citogenetike postavljeni su 1956. godine kada se utvrdilo da diploidna stanica čovjeka ima 46 kromosoma, a 1959. godine otkrivene su prve kromosomske aberacije u podlozi poznatih kliničkih sindroma te je definirano da je DS posljedica trisomije kromosoma 21 (33). Primjena tehnika pruganja kromosoma i napredak u području kulture stanica 70-ih godina omogućili su analizu i karakterizaciju numeričkih promjena te mikroskopski vidljivih strukturnih kromosomskih aberacija. Strukturne kromosomske aberacije nastaju kao posljedica promjene u strukturi kromosoma, a mogu nastati *de novo* ili biti naslijeđene od jednog od roditelja koji je „miran“ nositelj kromosomskog poremećaja. Promjena u strukturi kromosoma može biti balansirana i nebalansirana, ovisno o tome ima li za posljedicu promjenu u broju kopija DNA. Balansirane strukturne aberacije (inverzne i recipročne translokacije) ne uzrokuju promjene u broju kopija DNA, a nebalansirane strukturne aberacije (delecije, nebalansirane translokacije, duplikacije, marker kromosomi) za posljedicu uvijek imaju promjenu u broju kopija DNA unutar genoma. Aneuploidije (promjene u broju jednog ili više kromosoma)

predstavljaju oko 10 % uzroka MZ-a koji se mogu otkriti uobičajenim citogenetičkim metodama kao što je GTG-pruganje (Giemsa) (slika 2.1. i 2.2.) (34). Ta metoda ima moć razlučivanja 5 – 10 milijuna Mb pa poremećaji manji od 5 Mb ostaju neotkriveni. Tehnike kariotipizacije s visokom moći razlučivanja 3 – 5 Mb koje analiziraju kariotip na razini 550 – 1000 pruga otkrivaju dodatno još 3 – 4 % kromosomskih abnormalnosti (35, 36). U većini slučajeva riječ je o autosomnim aneuploidijama kao što je trisomija 21 – DS s prevalencijom 1 : 700 (37). Ostale rijetke aneuploidije uključuju trisomiju 13 – Patauov sindrom (PS) s prevalencijom između 1 : 5000 i 1 : 29000 živorođenih (38), trisomiju 18 – Edwardsov sindrom (ES) s prevalencijom od 1 : 3600 i 1 : 8500 (39), a obično su smrtonosne u prvim mjesecima života. Toj skupini pripadaju i spolne aneuploidije poput Klinefelterova sindroma (47,XXY) s prevalencijom 1 : 500 do 1 : 1000 novorođene muške djece (40), Turnerov sindrom s prevalencijom 1 : 2000 do 1 : 2500 novorođene ženske (41, 42) koji mogu biti intelektualno normalni, za razliku od trostrukog X sindroma s prevalencijom 1 : 1000 (43) koji mogu pokazivati stupanj intelektualnog oštećenja od graničnog do umjerenog.



Slika 2.1. Primjer normalnog muškog kariograma učinjenog GTG-pruganjem. Izvor: arhiva Laboratorija za medicinsku genetiku pri Medicinskom fakultetu Osijek.



Slika 2.2. Primjer pruganja kromosoma tehnikom CTG-a. Izvor: arhiva Laboratorija za medicinsku genetiku pri Medicinskom fakultetu Osijek.

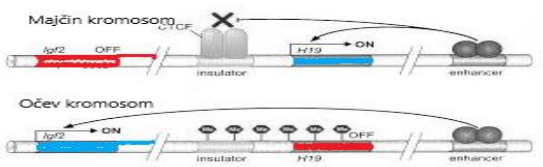
2.2. Mikrodelecijski sindromi

Strukturne kromosomske aberacije mogu dovesti do širokog spektra ozbiljnih kliničkih manifestacija, uključujući MZ i urođene malformacije. Velik broj kliničkih fenotipova uzrokovan je kriptičnim kromosomskim aberacijama koje su veličinom manje od 3 Mb te ih je nemoguće pouzdano identificirati metodom GTG-pruganja. Strukturne kromosomske aberacije veličinom manje od 5 Mb, a posebno one ≥3 Mb predstavljaju submikroskopske aberacije; mikrodelecije i mikroduplikacije (44). Pretpostavlja se da je ukupan udio poznatih strukturnih aberacija u skupini bolesnika s MZ-om oko 5,3 % (45). Mikrodelecijski su sindromi heterogena skupina sindroma i predstavljaju prepoznatljive entitete sa specifičnom kliničkom prezentacijom. Kliničke su odrednice sindroma posljedica disbalansa različitih gena susjedne lokalizacije te je Schmickel 1986.g. takve poremećaje nazvao sindromom susjednih gena (prema engl. *contiguous gene syndromes*). Većina je mikrodelecijskih sindroma posljedica gubitka kromosomskog segmenta i pridruženih genskih lokusa te je obično prisutna strukturna i funkcijska monosomija. Mikrodelecije mogu biti intersticijske ili zahvatiti krajeve kromosomskih krakova. Kod većine sindroma susjednih gena regije zahvaćene delecijom su omeđene relativno dugim homogenim ponavljajućim nizovima nukleotida. Te su regije podložne rekombinaciji i u tim su regijama identificirana mjesta lomova kromosoma kod većine mikrodelecijskih sindroma. Pretpostavlja se da, nejednaka intrakromosomska i interkromosomska kromatidna izmjena između graničnih ponavljajućih nizova nukleotida

uzrokuje gubitak i recipročnu mikroduplikaciju intersticijskog kromosomskog segmenta. Mikrodelecije mogu biti posljedica lomova u nestabilnim kromosomskim lokusima kao što su rijetka fragilna mjesta. U takovim je slučajevima lom kromosoma popraćen gubitkom acentričnog fragmenta i *de novo* sintezom telomernih sljedova DNA koje stabiliziraju kromosomsku strukturu. Klinička manifestacija sindroma susjednih gena može, osim delecije, biti rezultat drugih tipova kromosomskih aberacija kao što su translokacije ili inverzije s mjestima loma u kritičnoj regiji (46, 47).

Genomsko utiskivanje (prema engl. *genomic imprinting*) je metilacija baza citozina u CpG dinukleotidima tzv. CpG otocima (prema engl. *CpG islands*) molekule DNA koji su ključni regulatorni elementi gena (slika 2.3.). Mnogi utisnuti geni raspoređeni su u klastere (utisnute domene) veličinom od stotina do nekoliko tisuća kilobaza (kb). Utisnuti geni sudjeluju u intelektualnom razvoju, imaju ulogu u razvoju psihijatrijskih bolesti kao što shizofrenija i bipolarni poremećaj. Podložni su utjecaju okolišnih čimbenika putem epigenetskih promjena tako da se mijenja njihova ekspresija bez da mijenjaju slijed nukleotida u DNA. Uz to, fenomen genomskog utiskivanja s gubitkom heterozigotnosti pridonosi širokom spektru malignih bolesti. Uz metilaciju DNA, u genomski utisak su uključeni i drugi epigenetski čimbenici kao što su modifikacija histona (fosforilacija, acetilacija, metilacija, ubikvitinacija, sumoilacija), RNA interferencija (48). Do sada se pokazalo da je „utisnuto“ više od 150 ljudskih gena (49, 50). Metilacija se događa tijekom spermatogeneze ili oogeneze pa ekspresija gena ovisi o tome jesu li naslijeđeni od oca ili od majke. Gen koji je metiliran (inaktiviran) može se reaktivirati u muškoj ili ženskoj gametogenezi za sljedeću generaciju. Na primjer, majčinski utisnuti gen (inaktiviran metilacijom) može biti metiliran muškom gametogenezom i tako se prenijeti kao aktivni gen (51). Genetičke i epigenetičke promjene u ekspresiji utišanih gena dovode do poznatih malformacijskih sindroma kao što su Prader-Willijev sindrom (PWS), Angelmanov sindrom (AS), Beckwith-Wiedemannov sindrom (BWS) i Silver-Russellov sindrom (SRS) (52). Molekularne promjene koje dovode do kongenitalnih poremećaja su: uniparentna disomija (UPD), kromosomske aberacije, aberantna metilacija (epimutacije) i genomske mutacijeu utisnutim genima (53). UPD je nasljeđivanje oba homologna kromosoma od jednog roditelja. Uniparentna disomija je posljedica greške tijekom mejotičke diobe, formiranja trisomične zigote uz naknadni gubitak prekobrojnog kromosoma. Homolog koji sadrži neaktivan alel rezultira strukturnom disomijom, ali funkcionalnom nulisomijom (npr. majčina disomija 15 u PWS-u i očinska disomija 15 u AS-u). Kromosomske aberacije također mogu rezultirati gubitkom ekspresije utisnutog gena u slučaju delecija ili

translokacija ili pak rezultiraju prekomjernom ekspresijom dupliciranjem utisnutog kromosomskog materijala kao npr. u AS-u i PWS-u (54). Intragenske mutacije u utisnutim genima zabilježene su samo za BWS i SRS (55). Epimutacije aberantne metilacije različito metiliranih regija bez izmjena slijeda DNA čine do 50 % molekularnih promjena u MZ-u (56).



Slika 2.3. Primjer utiskivanja gena za faktor rasta 2 sličanu inzulinu (*Igf2*). Kao posljedica metilacije dijela molekule DNA podrijetlom od oca, regulatorni protein vezan za uzvodni pojačivač regulira ekspresiju gena *Igf2*. Na majčinom kromosomu ovaj dio nije metiliran, tako da je ekspresija gena blokirana vezanjem regulatornih proteina CTCF za izolator koji se nalazi između pojačivača i promotora gena *Igf2*. Izvor: Modificirano i uređeno prema https://biolozi.bio.bg.ac.rs/attachments/article/1232/Mob%20bio%203%20Geneti%c4%8dko%20utiskivanje.pdf

Kasnih 30-ih godina prošlog stoljeća američki genetičar Hermann Muller prvi je opisao jedinstvene kromosomske krajeve i njihove funkcije te ih nazvao telomerama. Proučavajući učinke radioaktivnog X-zračenja na eukariotske kromosome (istraživanje za koje je 1946. godine nagrađen Nobelovom nagradom za fiziologiju ili medicinu – otkrio je da mutacije mogu biti izazvane X-zračenjem) primijetio je kako su upravo spomenuti krajevi kromosoma otporni na učinke X-zraka. Istraživanje američke znanstvenice i citogenetičarke Barbare McClintock, također dobitnice Nobelove nagrade za fiziologiju ili medicinu kojom je nagrađena 1983. godine za otkriće transpozona ili „skakajućih gena“ (prema engl. *Jumping genes*) pomoglo mu je u donošenju zaključka da je ključna uloga telomera zaštita krajeva kromosoma od degradacije i fuzije s ostalim telomerama. Danas se zna da telomere ne sadrže aktivne gene, nego ponavljajući slijed DNA i specifično vezujuće proteine koji tvore jedinstvenu strukturu i koji su različiti od ostatka kromatina (57, 58). Prema istraživanjima, otprilike polovica svih strukturnih kromosomskih abnormalnosti upućuje na nepravilnosti vezane uz telomere (59, 60). Primjer su navedenog sindromi Wolf-Hirschhorn (WHS) i Cri du chat (CdCS) povezani sa specifičnim fenotipom (61). Većina slučajeva s dokazanim subtelomernim nepravilnostima nema poveznicu sa specifičnim fenotipom pa se testovi probira telomernih aberacija smatraju ključnim za postavljanje dijagnoze. Temeljem istraživanja otkriveno je da su u subtelomernim regijama posebno prisutne različite delecije i duplikacije koje čine varijacije u broju kopija kromosoma ili njihovih segmenata (prema engl. *copy number variation*, CNV), što su utvrdili

Sharp i suradnici (62), te mogu uzrokovati intelektualne smetnje i prirođene malformacije. Učestali CNV-ovi čine 20 – 40 % svih CNV-a, a dijelovi genoma u kojima se nalaze su regije segmentalnih duplikacija. Segmentne duplikacije čine više od 5 % ljudskog genoma i smještene su na podtelomerima i pericentromerama (63). Svaki dupliciran segment dijeli se između podskupine krajeva kromosoma i kreće se od 3 do 50 kb, čineći zonu umnožavanja od 5 do 300 kb na danom kraju kromosoma (64). Neposredno od subtelomernih duplikacija započinje područje DNA za koje se nekad smatralo da je „statičnije“ područje genoma, no nedavno su se dijelovi te zone pokazali polimorfnima. Višak ili manjak broja kopija u toj regiji otkriveni su u fenotipski normalnih osoba što sugerira da se toleriraju neke promjene u terminalnim regijama specifičnim za kromosome (65, 66). Kromosomske aberacije naslijeđene od fenotipski normalnog roditelja s istim strukturnim promjenama pretpostavljaju se kao varijante koje ne doprinose abnormalnostima probanda. Međutim, moguće je da neki naslijeđeni CNV-ovi pokazuju nepotpunu penetraciju što otežava kliničku interpretaciju. Smatra se da su subtelomerne strukturne aberacije uzrok MZ-a između 3 i 6 % djece s ranije postavljenom dijagnozom „idiopatskog MZ-a“ (67, 68, 69, 70). Studije pacijenata sa zajedničkim fenotipskim značajkama utvrdile su subtelomerna kritična područja povezana s bolestima te otkrile gene kandidate u podlozi MZ-a. Fenotip je kod većine mikrodelecijskih sindroma posljedica poremećaja nekolicine gena, a kod nekih može biti posljedica poremećaja, mutacije ili gubitka funkcije jednog gena uz autosomno dominantan (AD) način nasljeđivanja. Incidencija sindroma je veoma varijabilna. Pojedini su sindromi veoma rijetki, dok se drugi češće susreću u humanoj patologiji. Danas je poznato više od 20 mikrodelecijskih sindroma, a među češće mikrodelecijske sindrome ubrajaju se: DiGeorgeov sindrom, Prader-Willijev sindrom, Angelmanov sindrom, Williams-Beurenov sindrom i drugi.

DiGeorgeov sindrom (OMIM#188400) je najčešći mikrodelecijski sindrom s učestalošću od 1 : 4000 živorođene djece. U više od 90 % slučajeva je posljedica novonastale mutacije. Dismorfija uključuje mikrocefaliju, uske očne rasporke, hipertelorizam, širok vršak nosa, mikrognatiju, male i loše oblikovane uške. Oko 75 % pacijenata imaju pridruženu srčanu grešku, rascjep nepca ili velofaringealnu insuficijenciju, nedostatak timusa ili paratireoidnih žlijezdi, provodnu nagluhost, anomalije koštanog sustava, usporen jezično-govorni razvoj, poteškoće s učenjem, psihijatrijske poremećaje. Tjelesno napredovanje je slabije, a MZ je blago do umjereno (71). Uzrok DGS-a posljedica je delecije regije 22q11.2, što rezultira mikrodelecijom od 1,5 – 3 Mb na dugom kraku kromosoma 22. U 90 % slučajeva veličina delecije je oko 3 Mb što se definira kao tipično izbrisano područje (prema engl. *typically*

deleted region, TDR), dok je u oko 7 % veličina delecije manja od 1,5 Mb (72). Kromosomska regija od 3 Mb sadrži više od 35 gena, a gen *TBX1* (OMIM*602054) se smatra odgovornim za karakterističnu kliničku sliku pacijenata s DGS (73). *TBX1* gen kodira transkripcijski faktor T-box obitelji, a izražen je u endodermu i mezodermu ždrijelnih lukova. Haploinsuficijencija gena utječe na morfogenezu organa, što uzrokuje karakterističan fenotip sindroma (74). Nedavna istraživanja pokazala su da delecija 22q11 utječe na kortikalnu neurogenezu i migraciju, što može objasniti poremećaje u mentalnom razvoju kod pacijenata, ali i psihijatrijske poremećaje koje imaju pacijenti s DGS-om (75). Katehol O-metiltransferaza (prema engl. *Catechol-O-methyltransferase*, COMPT) je enzim koji sudjeluje u razgradnji neurotransmitera kao što je dopamin. Enzim prolin dehidrogenaza (oksidaza)1 (prema engl. *Prolin dehydroegnase 1*, PRODH) onemogućava razgradnju prolina što rezultira hiperprolinemijom. Haploinsuficijencija gena *COMPT i PRODH* smatra se uzročnikom psihijatrijskih poremećaja i poremećaja ponašanja kod pacijenata s DGS-om (76). Nekoliko drugih gena u regiji 22q11, poput gena za regulaciju histonskog staničnog ciklusa (*HIRA*, OMIM*600237), gen sličan degradaciji ubikvitina (*UFD1L*, OMIM*601754) i protein sličan Crk (*CRKL*, OMIM*602007), uključeni su u patogenezu DGS-a.

Prader-Willijev sindrom (OMIM#176270) je mikrodelecijski sindrom s prevalencijom od 1 : 15000 do 1 : 30000 u općoj populaciji. Klinička slika uključuje dismorfiju lica koju karakterizira dolihocefalija, uski očni rasporci, oči bademastog oblika, tanka gornja usna i spušteni usni kutovi, svijetla kosa i oči, strabizam. Bolesnici imaju intrauterini zastoj u rastu (prema engl. *Intrauterine growth restriction*, IUGR), hipotoniju u dojenačkom razdoblju i kašnjenje u psihomotoričkom razvoju. U dječjoj dobi imaju pojačan apetit što rezultira prekomjernom tjelesnom masom, a konačnu visinu skoro nikada ne dosegnu. Kasnije u pubertetu sindrom karakterizira hipogonadotropni hipogonadizam. Većina bolesnika ima lako do umjereno MZ (77). Posljedica je nedostatka funkcionalne očinske kopije regije 15q11-13 na kromosomu 15. Najčešći uzork je delecija regije 15q11-13 majčinog podrijetla u 65 – 75% slučajeva, majčinska uniparentna disomija kromosoma 15 u 20 – 30 % slučajeva, te poremećaj utiskivanja očinskog kromosoma 15 u 1– 3 % slučajeva (78).

Angelmanov sindrom (OMIM#105830) je rijedak mikrodelecijski sindrom s prevalencijom od 1 : 15000. Posljedica je nedostatka funkcionalne majčine kopije regije 15q11-13 na kromosomu 15. Uzroci su delecija regije 15q11-13 majčinog podrijetla u 70 % slučajeva, točkaste mutacije *UBE3A* gena unutar 15q11-q13 u 5 – 10% slučajeva, poremećaj utiskivanja majčinog kromosoma 15 u 3 – 5% i očinska uniparentna disomija u 1 – 2 % slučajeva (79).

Klinička slika AS-a uključuje odstupanja u kognitivnom razvoju, poremećaje kretanja i ravnoteže, teškoće u razvoju jezika i govora, poremećaje hranjenja i epilepsiju. Hipotonija je prisutna u dojenačkoj dobi dok je kasnije prisutan hipertonus i hiperrefleksija. Psihomotorički razvoj je usporen, a neki pacijenti ne prohodaju do 5-e godine života. Pacijenti s AS-om imaju karakteristčno ponašanje koje uključuje hiperaktivnost, napade smijeha i pljeskanje rukama. Većina pacijenata ima mikrocefaliju, hipopigmentaciju šarenice i strabizam (80). Kromosomska regija 15q11-q13 veličine je 4 Mb i unutar nje se nalaze dvije domene utisnutih gena (PWS i AS domene) koje se protežu na 2 Mb, zatim imprinting centar (IC), te geni eksprimirani s oba alela (81). PWS regija sadrži gene izražene samo sa očeve kopije homolognih alela, a to su: *MKRN3* gen (OMIM*603856) član proteinske obitelji koja ima funkciju ubikvitin ligaze, *MAGEL2* gen (OMIM*605283*)* predstavlja tumorski melanomski antigen, *NDN* gen (OMIM*602117), supresor rasta eksprimiran u postmitotičkim neuronima i *C15ORF2* gen (OMIM*610922), eksprimiran samo u testisima i fetalnom mozgu. Nije pronađen specifičan gen koji bi bio odgovoran za sve fenotipske karakteristike PWS-a, te se smatra da su one rezultat poremećaja barem nekoliko gena ove regije. Manja, AS regija, sastoji se od *UBE3A* gena (OMIM*601623) i *ATP10A* gena (OMIM*605855). Nedostatak izražaja majčine kopije *UBE3A* gena u mozgu uzrokovat će razvoj AS-a. To je gen koji kodira za ubikvitin proteinsku ligazu E3A, enzim potreban za degradaciju proteina i za sinaptičko potenciranje u ranom razvoju mozga. Predominantna mjesta u mozgu u kojima je *UBE3A* aktivan su hipokampus i Purkinjeove stanice malog mozga, što objašnjava neurološke simptome kod pacijenata. Drugi gen AS regije, *ATP10A*, kodira adenozintrifosfatazu (ATP-azu) koja sudjeluje u transportu aminofosfolipida. Za razvoj AS-a dovoljna je mutacija samo *UBE3A* gena, no smatra se da ako uz nju postoji i mutacija *ATP10A* gena, klinička slika će biti nešto teža (82, 83). Distalno od PWS/AS regije se nalaze geni za GABA receptore (*GABRB3, GABRA5 i GABRG3*), zatim gen za okulokutani albinizam tipa 2 (*OCA*, OMIM*611409), *HERC2* gen (OMIM*605837) i *GOLGA8* gen (OMIM*609619). Ovi geni su izraženi sa oba roditeljska alela i utječu na fenotipske karakteristike, kao i na nastanak autizma kod pacijenata (84).

Williams-Beurenov sindrom (OMIM#194050) je rijedak mikrodelecijski sindrom sa prevalencijom od 1 : 20000 do 1 : 25000. Posljedica je delecije u regiji 7q11.23, a veličine je od 1,55 do 1,84 Mb. Naslijeđuje se AD, iako je u više od 90 % slučajeva posljedica novonastale mutacije. Pacijenti imaju karakterističan fenotip koji uključuje prirođene srčane greške od kojih je najčešća supravalvularna aortna stenoza, hiperkalcemiju u novorođenačkoj

dobi, hipotireoidizam, preuranjeni pubertet, slabije tjelesno napredovanje, hipertenziju, blago do umjereno MZ (85). Dismorfija uključuje okruglo lice, pune obraze, velika i puna usta, širok nosni korijen. Regija 7q11.23 adrži 28 gena od kojih su geni *CLIP2, GTF2I, GTF2IRD1, LIMK1* odgovorni za intelektualne poteškoće kod bolesnika. *ELN* gen (OMIM*130160) kodira stvaranje proteina koji se naziva tropoelastin, a smatra se uzročnikom supravalvularne aortne stenoze i pojačane pokretljivosti zglobova kod pacijenata s WBS (86).

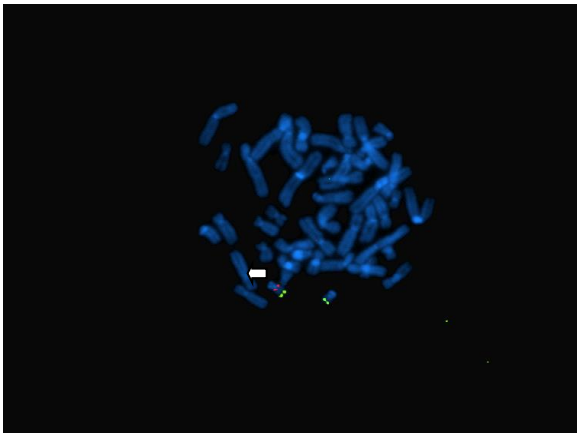
Cri du chat sindrom (OMIM#123450) je rijedak mikrodelecijski sindrom uzrokovan delecijom dijela kratkog kraka na kromosomu 5. Prevalencija sindroma se kreće od 1 : 15000 do 1 : 50000, a delecija je u većini slučajeva novonastala. Ime „cri du chat“ dolazi od jedinstvenog plača koji nalikuje glasanju mačke. Kliničku sliku karakterizira teško MZ te fenotip koji uključuje mikrocefaliju, okruglo lice, hipertelorizam, mikrognatiju, epikantalne nabore, nisko položene uške, hipotoniju i motoričko zaostajanje. Malformacije, iako rijetke mogu biti prisutne i uključuju srčane anomalije, anomalije mokraćnog sustava, preaurikularne privjeske, sindaktiliju, hipospadiju i kriptorhizam (87). Delecije mogu varirati u veličini, od izuzetno malih i uključuju samo regiju 5p15.2, pa do delecije cijelog kraka. Molekularnom citogenetikom utvrđeno je da je regija 5p15.3 odgovorna za tipičan plač, dok je regija 5p15.2 odgovorna za ostale fenotipske karakteristike sindroma (88). Dva gena, semaforin F (*SEMAF;* OMIM*604462) i δ-katenin (*CTNND2*, OMIM*604275), uključeni su u moždani razvoj i njihova delecija može biti povezano s MZ-om kod pacijenata s CdCS-om. Delecija gena reverzne transkriptaze telomeraze (*TERT*) lokalizirana na 5p15.33, mogla bi pridonijeti fenotipskim promjenama u CdCS (89). *TERT* gen (OMIM*187270) ima ulogu u održavanju duljine telomera i proliferaciji stanica.

Wolf-Hirschhornov sindrom (OMIM#194190) je mikrodelecijski sindrom uzrokovan delecijom dijela kratkog kraka kromosoma 4 (4p16.3). Prevalencija sindroma je 1 : 50000. U 90 % slučajeva je novonastao. Kliničku sliku karakterizira zakašnjeli psihomotorički razvoj, hipotonija mišića, epilepsija, prirođena srčana greška i dismorfija lica koja uključuje mikrocefaliju, mikrognatiju, kratki filtrum, istaknutu glabelu, hipertelorizam, kolobom šarenice (90). WHS kritična regija (4p16.3) veličinom je 165 kb, a sadrži gene *LETM1, WHSC1* i *WHSC2*. Gen *LETM1* (OMIM*604407) kodira protein koji se nalazi na unutrašnjoj strani membrane mitohondrija i ima ulogu u održavanju morfologije mitohondrija. Dio je obitelji EF domene-kalcij vezajućeg proteina (prema engl. *EF hand*) koji regulira unutarstaničnu koncentraciju kalcija. Poremećena homeostaza kalcija u živčanim stanicama ima za posljedicu

neurodegenerativne poremećaje i epilepsiju (91). Stoga se gen *LETM1* smatra genom kandidatom za razvoj epilepsije kod WHS-a. Gen *WHSC1* (OMIM*602952) kodira protein prisutan u embrionalnim tkivima, a odgovoran je za rast i razvoj, te se smatra odgovornim za većinu fenotipa sindroma (92). Gen *WHSC2* (OMIM*606026) kodira protein negativnog faktor elongacije A (NELF-A) koji sudjeluje u regulaciji transkripcije RNA polimeraze II.

2.3. Molekularno-citogenetičke i tehnike molekularne genetike u detekciji kromosomskih aberacija

Razvoj FISH tehnika započeo je krajem 80-ih godina prošlog stoljeća čime je započelo razdoblje molekularne citogenetike koja je povećala moć rezolucije istraživanja kromosoma te ima veliku primjenu u identifikaciji suptilnih i submikroskopskih kromosomskih aberacija u podlozi MZ-a (slika 2.4.). Tehnika omogućava otkrivanje kriptičnih i submikroskopskih strukturnih kromosomskih aberacija, promjene broja kromosoma, određivanje mehanizama nastanka kromosomske aberacije te mikroskopski vidljivih strukturnih poremećaja kromosoma manjih od 5 Mb koje G-prugama nije bilo moguće precizno odrediti (93, 94, 95).



Slika 2.4. Primjer analize kromosoma tehnikom fluorescentne in situ hibridizacije (FISH) − mikrodelecijski sindrom: DiGeorge/ Velokardiofacijalni / 22q11 mikrodelecijski sindrom 46,XY.ish del(22)(q11.21)(D22S75-). Odsustvo crvenog signala u proksimalnom segmentu dugog kraka kromosoma 22 ukazuje na deleciju lokusa (strelica). Izvor: fotografija iz arhive Laboratorija za medicinsku genetiku pri medicinskom fakultet Osijek.

Dok je za metode klasične citogenetike nužna kultivacija stanica, FISH se može primjenjivati i na nekultiviranim stanicama, odnosno na interfaznoj jezgri. FISH kao komplementarna tehnika u citogenetičkoj analizi ima visoku specifičnost i osjetljivost pri otkrivanju strukturnih i numeričkih promjena u genomu, prepoznavanju nepoznatog kromosoma ili jednog njegovog malog dijela koji nije moguće morfološki prepoznati. Tri su

glavne kategorije DNA-molekule koje se upotrebljavaju kao sonde u FISH-u: centromerne sonde (prema engl. *centromere specific probes*), sonde za cijeli kromosom ili dio kromosoma (prema engl. *whole/partial chromosome paint probes*, WCP/PCP) i sonde za mala specifična područja eukromatina (prema engl. *single copy ili unique sequence probes*) u što se ubrajaju i subtelomerne sonde. Veličina proba se kreće od 50 – 300 nukleotidnih baza. U ranim 90-im godinama prošlog stoljeća dolazi do razvoja višebojne FISH analize (prema engl. *multicolor-FISH,* M-FISH) u cilju olakšanog analiziranja složenih kromosomskih aberacija i utvrđivanja marker kromosoma. Ova se metoda najčešće upotrebljava u svrhu razjašnjenja aberiranih kariotipova utvrđenih GTG-pruganjem. Ovom tehnikom došlo je do revolucionarnog razvoja molekularne citogenetike, posebno u analizi tumora i prenatalnoj dijagnostici. Nedostatak tehnike je nemogućnost utvrđivanja nepoznatih kromosomskih aberacija i mikrodelecija manjih od 190 kb, te nedostupnost probi. Primjenom FISH analize utvrđene su abnormalnosti kromosoma u oko 5 – 6 % osoba s MZ-om (96, 97, 98, 99, 100, 101, 102). Noviji pristup u analizi genoma predstavlja metoda višestrukog umnažanja vezanih sondi (prema engl. *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification,* MLPA) koja se temelji na lančanoj reakciji polimeraze (prema engl. *Polymerase Chain Reaction,* PCR), a čiji dizajn omogućava istovremenu kvantifikaciju do 50 različitih DNA sljedova veličine 50 – 60 nukleotidnih parova uz minimalnu količinu DNA uzorka (20 ng). Svaka je MLPA proba dugačka 100 – 500 nukleotida, sastavljena je od kombinacije popunjujućih sljedova i sljedova od interesa različitih duljina što omogućava istovremenu hibridizaciju do 50 proba. Jednostavnost primjene MLPA tehnike omogućila je njezinu brzu implementaciju u evaluaciji pacijenta s MZ-om (103, 104). Nedostatak metode je što ne detektira balansirane promjene, točkaste mutacije, mozaicizam. Zbog svoje niske osjetljivosti, promjena utvrđena MLPA analizom zahtjeva potvrdu drugom metodom (FISH ili aCGH) (105). Dostupna su 74 različita MLPA kita u kategoriji neurorazvojnih poremećaja (MRC-Holland, www.mlpa.com) koja sadržavaju različite kombinacije proba te omogućavaju jednostavno i isplativo testiranje pacijenata s MZ-om. Zbog svoje brzine i relativne jednostavnosti, MLPA brzo zamjenjuje subtelomerni FISH (106, 107, 108, 109, 110). Koolen i suradnici tom su metodom utvrdili učestalost kriptičkih subtelomernih aberacija od 4,3 % kod djece s umjerenim MZ-om (111). Uvođenjem tehnike biočipova koja omogućava probir cijelog genoma na višak/manjak specifičnih DNA sljedova ostvaren je značajan napredak u području rezolucije otkrivanja genomskih aberacija. Godine 1997. postavljena je tehnička osnova aCGH. Metoda se temelji na fluorescentnom označavanju uzorka i referentne DNA različitim bojama, koje se potom istovremeno hibridiziraju na mikročipove s oligonukleotidima (“probe”). Mikročipovi s oligonukleotidima se sastoje od

umjetno sintetiziranih kratkih specifičnih sljedova nukleotida, koji su jedinstvenog redoslijeda u genomu i predstavljaju specifičan odsječak humanog genoma. Razlika u hibridizaciji fluorescentno obojanog uzorka i referentne DNA se detektira kao razlika u intenzitetu boja, što je osnova za procjenu prisutnosti promjene u broju kopija genomskog segmenta. aCGH metoda ima vrlo visoku rezoluciju (do 100 kb), čime se omogućuje ispitivanje cijelog ljudskog genoma na razini razlučivanja koja je ~50 – 1000 puta veća nego rutinska kromosomska analiza GTG-pruganjem (112, 113). Osjetljivost je te metode vrlo velika, a rezolucija ovisi o veličini i razmaku između klonova koje nalazimo na matrici. Razvijeno je nekoliko vrsta mikročipova koji se sastoje od sintetiziranih bakterijskih umjetnih kromosoma (engl. *bacterial artificial chromosome,* BAC), oligonukleotida i polimorfizama jednog nukleotida (engl. *single-nucleotide polymorphism,* SNP). BAC mikročipovi su među prvim implementiranim mikročipovima u genetici (114). Duljina BAC-ova može varirati od 150 – 200 kb. Zbog svoje skupoće i složenosti proizvodnje, te ograničenja u veličini proba, njihovu primjenu u genetici zamjenjuju oligonukleotidni mikročipovi. Oligonukleotidni mikročipovi omogućuju fleksibilnost u dizajnu sonde, veću pokrivenost i mnogo veću razlučivost. Mogu biti razmješteni ciljano, na mjestima gdje se nalaze poznati mikrodelecijski/duplikacijski sindromi (engl. *targeted array*) ili su raspršeni po cijelom genomu (engl. *tiling path*). Ciljani nizovi obično pokrivaju telomere i poznata područja delecije i/ili duplikacije i isključuju područja s CNV. Prednosti ciljanih nizova što omogućuju dijagnozu dobro poznatih sindroma uz minimalnu detekciju varijanti broja kopija nepoznatog značenja. Suprotno tome, mikročipovi koji pokrivaju gotovo čitav genom mogu otkriti patološke promjene koje su povezane s MZ-om i time dodatno otkrivaju oko 14 – 20 % aberacija. Oko 9 – 10 % jesu intersticijske, a ostale subtelomerne (115, 116, 117, 118, 119, 120, 121). SNP mikročipovi se koriste za detekciju varijacija unutar genoma, a koriste se u dijagnostici UPD-a, triploidija i konsangviniteta, te u farmakogenetici i dijagnostici karcinoma. Uporaba SNP mikročipova visoke rezolucije do 0,7 kb koji uključuju kodirajuće i nekodirajuće regije, u dijagnostici MZ-a može predstavljati problem zbog preklapanja CNV-ova sa polimorfizmima u genomu, kao i regijama koje ne sadrže poznate gene, te se rijetko primjenjuje u istraživanju MZ-a. Metoda aCGH dovela je do otkrića genomskih preraspodjela od nekoliko kilobaza do megabaza što rezultira CNV-om. Analizom SNP-ova duž genoma identificirano je 1447 CNV-ova koji su prisutni u 12 % (360 Mb) ljudskog genoma, što uključuje stotine gena i lokusa odgovornih za bolesti. Pretpostavlja se da su CNV uzrokom različitosti među ljudima i da su odgovorni za evolucijske procese, no isto tako mogu imati utjecaj na klinički fenotip (122). S obzirom na to da je više od 40 % svih gena izraženo u ljudskom mozgu, varijacije broja kopija mogle bi značajno doprinositi

kognitivnim, bihevioralnim i psihološkim različitostima unutar populacije. Sharp i suradnici (2005) su korištenjem bioinformatičkih analiza segmentnih duplikacija u genomu dizajnirali mikropostroj s 2007 BAC čipova specifičnim za 130 genomskih regija za koje je utvrđeno da su povezane s nisko ponavljajućim sljedovima DNA. Uporabom tih mikropostroja utvrđeno je oko 16 patogenih varijanti koje se povezuju s MZ-om (123). Značajan napredak u otkrivanju broja kopija povećao je broj utvrđenih genetičkih poremećaja. Intragenske mutacije su uzrok mnogih bolesti i povezane su s nizom sindromskih poremećaja, kao i s MZ-om. Metoda aCGH ima sve veću rezoluciju kojom je omogućeno otkrivanje patogenih aberacija unutar jednoga gena, no ne pokriva svaki egzon u genu te ne može utvrditi intragenske mutacije. Prema literaturnim podacima oko 40 % intragenskih mutacija može uključivati samo jedan ili dva egzona unutar gena te je potrebno analizom pokriti sve egzone ciljanih gena (124). Sve veća potreba za ispitivanjem prethodno nedefiniranih gena, uvela je mikročipove koji sadrže egzone. Ne samo da je cijena egzonskih čipova niža od cijene sekvenciranja sljedeće generacije (prema engl. *Next genome sequencing*, NGS), nego je dizajnirana za otkrivanje rijetkih varijanti u egzonu koje mogu biti povezane sa idiopatskim MZ-om (125). Prednosti aCGH su velike: otkriva nebalansirane poremećaje u cijelom genomu, jednostavnija je i brža u odnosu na FISH i MLPA, količina uzorka je mala, omogućava kraće vrijeme do rezultata, ne zahtijeva da su stanice u fazi diobe, koristi manje osnovnog radnog materijala i omogućava automatizaciju cijelog postupka. Nedostatak je metode u tome da ne otkriva balansirane poremećaje, a otkriva veći broj polimorfnih varijacija što predstavlja problem pri tumačenju nalaza. Nerijetko za neke aberacije nije jasno jesu li uopće povezive s kliničkom slikom bolesnika jer danas se još nedovoljno poznaje fenotipski učinak viška/nedostatka genetičkog materijala u pojedinim regijama kromosoma. Kako bi se utvrdilo je li uočeni poremećaj na kromosomu povezan s kliničkom slikom, nužno je najprije potvrditi aberaciju nekom od drugih raspoloživih tehnika, a potom ispitati roditelje da se vidi je li poremećaj naslijeđen ili je nastao *de novo*. Roditelji mogu biti zdravi, ali i zahvaćeni blaže od djece. Razlika u kliničkoj slici između roditelja i djeteta može se objasniti varijabilnošću ekspresije fenotipa, a u nekim slučajevima i genetskim biljegom ili razlikom u veličini delecije između zahvaćenog roditelja i djeteta. Patogene varijante otkrivene su u 15 – 20 % bolesnika s MZ-om (126, 127). Ne uzrokuju svi CNV-ovi cijeli spektar fenotipova, uključujući MZ, autizam, shizofreniju i dimorfizme, a takvi CNV-ovi mogu predstavljati izazove genetskom savjetovanju.

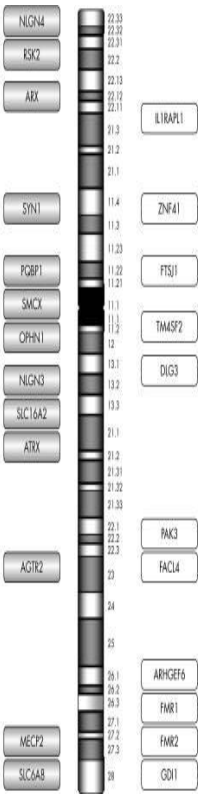
2.4. Monogenske bolesti

Bolesti koje nastaju kao rezultat promjena pojedinih gena nazivaju se monogenskim poremećajima, a određene su klasičnim Mendelovim obrascem nasljeđivanja. Šezdesetih godina prošlog stoljeća, temeljem opažanja velikog broja obiteljskih slučajeva MZ-a koji su u nekim slučajevima bili znatno češći i slijedili su Mendelov obrazac nasljeđivanja, postavljen je koncept prema kojemu su aberacije specifičnih gena odgovorne za razvoj MZ-a. Uvođenjem tehnologije NGS-a povećao se broj identificiranih gena. Do sada je više od 7000 gena povezano s monogenskim oblicima MZ-a (128). Monogenski se poremećaji mogu klasificirati prema načinu nasljeđivanja: autosomno dominantno, autosomno recesivno (AR) ili X-vezano mentalno zaostajanje (X-MZ). Ovisno o kliničkom izražaju, MZ se dijeli u dvije skupine: sindromsko i nesindromsko MZ. U nesindromskom MZ-u jedina je patološka manifestacija kognitivan deficit i nema promjena u fenotipu kao ni pridruženih anomalija organskih sustava. Sindromsko MZ povezano je s fenotipskom dismorfijom (kraniofacijalna, koštana), promjenama rasta, neuromuskularnim promjenama i metaboličkim bolestima.

Prevalencija autosomno dominantnog mentalnog zaostajanja (ADMZ) ovisi o udjelu srodnih i nesrodnih brakova, a procjenjuje se na 1,5 – 2 % (129, 130). Za blaže oblike (IQ<70) iznosi 1,5 – 2 %, dok se za teže oblike MZ-a (IQ <50) procjenjuje na 0,3 – 0,5 %. SysID baza podataka (131) navodi 654 gena koji uzrokuju 535 bolesti povezanih s ADMZ-om, a uključeno je i 310 gena. Literatura navodi više podataka o broju gena, a procjenjuje se da je više od 1000 različitih gena povezano s ADMZ-om, dok neki autori navode čak i više od 2000 gena (132, 133, 134, 135, 136). Najčešće mutirani geni kao uzrok ADMZ-a su: *SCN2A, ANKRD11* (KBG sindrom), *SATB2* (Glass sindrom), *SYNGAP1, DYRK1A, MED13L, STXBP1, CTNNB1, KCNQ2, KMT2A* (Wiedemann-Steiner sindrom), *FOXP1, PACS1* (Schuurs-Hoeijmakers sindrom), *SMARCA2* (Nicolaides-Baraitser sindrom) i *WDR45* (137). Dobro je poznato da je MZ kod nekih pojedinaca uzrokovan mutacijama u više gena. U retrospektivnoj analizi 7374 bolesnika, molekularna dijagnoza uspostavljena je nakon sekvenciranja cijelog egzona kod 2076 bolesnika, a 4,9 % njih imalo je dijagnozu koja je uključivala dva ili više gena (138). Novonastale (*de novo*) mutacije čine 42 % uzroka ADMZ-a, a kao uzrok se smatra somatski mozaicizam kod roditelja. Visoka roditeljska dob smatra se jednim od rizičnih čimbenika za nastanak *de novo* mutacija. Analiza autosomnih *de novo* mutacija visoke pouzdanosti (n = 8409) otkrila je snažan učinak starije očinske dobi (139) i blaži učinak majčinske dobi na nastanak mutacija (139).

Procjenjuje se da je prevalencija autosomno recesivnog mentalnog zaostajanja (ARMZ) oko 10 %, s tendencijom rasta u još uvijek nerazjašnjenim slučajevima. Rizik od ARMZ-a veći je kod konsangvinih brakova i predstavlja 2 do 3 puta veći rizik nego u općoj populaciji (140). Osim metaboličkih poremećaja, ARMZ je vrlo heterogeno i manje rašireno u općoj populaciji. SysID baza podataka (131) navodi 684 gena povezanih s ARMZ-om. Prema različitim literaturnim izvorima, identificirano je više od 2000 gena koji uzrokuju ARMZ (141, 142, 143). Najčešće geni kao uzrok ARMZ-a prema bazama podataka HGMD (engl. *Human gene mutation database*) i ClinVar su *GALT, VPS13B, ASPM, SPG11, MUT, GLDC, CEP290, POLG, LAMA2,* and *SMPD1* (144).

Početkom 70-ih godina prošlog stoljeća, temeljem opažanja da je MZ češći kod muškog spola kao i opisa većeg broja obiteljski povezanih bolesnika kod kojih se mogao uočiti X-vezani obrazac nasljeđivanja, postavljen je temeljni koncept da su aberacije gena na X kromosomu važan etiološki čimbenik MZ-a. X-MZ (engl. *X-linked mental retardation – XLMR; X-linked intellectual disability – XLID)* čest je uzrok monogenskog MZ-a jer se većina gena koji uzrokuju MZ nalazi na X kromosomu. Veća je prevalencija MZ-a među muškarcima u odnosu na žene (1,8 : 1000 muškaraca; nosioci 2,4 : 1000). Kod ženskih nositelja mogu biti prisutni blaži simptomi radi inaktivacije X kromosoma (145). Poznato je više od 160 sindromskih poremećaja X-MZ-a te velik broj obiteljskih slučajeva nesindromskog X-MZ-a, od kojih je 95 mapirano na X kromosomu. Mutacije u više od 120 X-vezanih gena odgovorne su za više od 80 sindromskih oblika MZ-a te za više od 35 obiteljskih slučajeva nesindromskog X-MZ-a koje su mapirane na X kromosomu (146, 147) (slika 2.5.).



Slika 2.5. Shematski prikaz najčešćih gena na X kromosomu povezanih s X-vezanim mentalnim zaostajanjem. Izvor: Modificirano i uređeno prema https://www.latunisiemedicale.com/article-medicale-tunisie_1085_en.

Fragilni X sindrom (FRAXA, OMIM#309550), poznat kao Martin-Bellov sindrom, prvi su put opisali Martin i Bell 1943. godine (148). Najčešći je oblik sindromskog X-MZ-a (20 % svih slučajeva X-MZ-a) s prevalencijom od približno 1 : 5000 do 1 : 7000 muškaraca i uzrokuje intelektualne poteškoće u otprilike 1 : 4000 do 1 : 6000 žena (149). U gotovo 100 % pacijenata s fraginim X sindromom nalazi se neumjereno umnažanje CGG tripleta na 5-nekodirajućem dijelu gena te abnormalna metilacija *FMR-1* gena (OMIM*309550). CGG slijed kod zdravih osoba iznosi 5 – 44 ponavljanja (normalni aleli), dok zahvaćene osobe sa sindromom fragilnog X imaju slijed veći i od 200 CGG tripleta (puna mutacija). Intermedijarni aleli broje od 45 – 54 ponavljanja i ne uzrokuju fragilni X-sindrom, no 14 % njih je nestabilno i može se proširiti u premutacijski alel kada se prenosi preko majke. Premutacijski aleli imaju od 55 – 200 ponavljanja te žene koje ih nose imaju rizik rađanja djeteta sa sindromom fragilnog X sindroma. Premutacija može biti uzrok preuranjenog zatajenja jajnika u žena, a u muškaraca također može uzrokovati pojavu sindroma tremora/ataksije povezanog sa fragilnim X sindromom. *FMR-1* gen lociran je na dugom kraku X kromosoma u kromosomskoj regiji Xq27.3 i sadrži 17 egzona koji obuhvaćaju 38 kb genomske DNA. Produkt *FMR-1* gena je

FMRP (prema engl. *fragile X mental retardation protein*), regulatorni protein koji veže glasničku ribonukleinsku kiselinu (prema engl. *messenger ribonucleic acid,* mRNA) u neuronima. FMRP protein ima veoma važnu ulogu u regulaciji sinteze bjelančevina u središnjem živčanom sustavu. Intenzivno se sintetizira u vrhovima dendritičnih nastavaka kao odgovor na sinaptičku aktivnost. Kod pacijenata sa punom mutacijom, proizvodnja FMRP proteina izostaje zbog hipermetilacije u području *FMR-1* gena, te posljedično dolazi do poremećaja u razvoju mozga i nastajanja abnormalnih sinapsi. Mutacije *FMR-1* gena također dovode do prekomjerne aktivnosti metabotropnog glutamatnog receptora 5 (mGluR5), što u konačnici rezultira mnogim simptomima fragilnog X sindroma. FMRP je prisutan i u drugim tkivima u tijelu, međutim, njegova uloga nije još do kraja razjašnjena. U veoma malog broja pacijenata, kao uzrok ovog sindroma mogu se naći delecije i točkaste mutacije (150, 151). Muškarci imaju tipičan fenotip, karakteriziran dugim licem, velikim i loše modeliranim ušima te makroorhizmom. Oboljeli se također mogu prezentirati s raznolikim neuropsihijatrijskim poremećajima. U 16 – 30 % pacijenata mogu se zamijetiti elementi ponašanja iz autističnog spektra. Sama dijagnoza autizma postavlja se u 20 % žena i 30 % muškaraca s fragilnim X sindromom. Često se u pacijenata može opaziti i ponašanje slično onome u poremećaju s nedostatkom pažnje i hiperaktivnošću (prema engl. *Attention deficit hyperactivity disorder,* ADHD). Od ostalih psihijatrijskih poremećaja, također se mogu pojaviti depresija, anksioznost te opsesivno kompulzivni poremećaj. Žene heterozigoti imaju 30 %-tnu vjerojatnost posjedovanja normalnog kvocijenta inteligencije i 25 %-tnu vjerojatnost za granično kognitivno funkcioniranje, no bez obzira na to, većina ima poteškoće s učenjem i emocionalne poteškoće. Fenotip kod žena ovisi o fenomenu inaktivacije X-kromosoma – fenomenu lajonizacije (152).

Drugi poznatiji gen koji uzrokuje X-MZ jest *MECP2* (OMIM*300005) na kromosomu Xq28 koji uzrokuje Rettov sindrom. Prevalencija se procjenjuje na oko 1 : 10000 do 1 : 15000 žena (153). Za mušku djecu najčešće je letalan, no opisano je nekoliko slučajeva gdje kod živorođene muške djece uzrokuje teže oblike encefalopatije te kod odraslih muškaraca kod kojih se povezuje sa psihozom, ekstrapiramidalnim poremećajima, parkinsonizmom i makroorhidizmom (PPM-X sindrom; OMIM#300055). Uz klasični oblik, mutacije u ovom genu kod ženske djece mogu uzrokovati atipični Rettov sindrom te blage poteškoće u učenju. Do danas je otkriveno više od 390 patogenih mutacija, a 8 najčešćih čini više od 50 % svih mutacija. C-terminalna domena gena je sklona malim delecijama (20 – 100 parova baza) koje čine oko 7 % patogenih mutacija. Pronađene su i velike delecije (kilobazne veličine) koje brišu

cijele egzone, a nalazimo ih u 8 % bolesnica s klasičnim i u 3 % s atipičnim Rettovim sindromom. Spektar fenotipova s mutacijama u genu MECP2, osim klasičnog i atipičnog Rettovog sindroma, obuhvaća i druge neurološke poremećaje, a u manjem dijelu bolesnika s Rettovim sindromom ne nalazimo mutacije u genu MECP2. Stoga otkrivanje mutacije u MECP2 može potvrditi kliničku dijagnozu, ali je ne može u potpunosti isključiti. Molekularno testiranje pogotovo je važno u razjašnjavanju dijagnoze atipičnih oblika (154). Klinička slika uključuje mikrocefaliju, MZ, autistično ponašanje, ataksiju, karakteristične stereotipne kretnje ruku i gubitak njihove svrhovite funkcije. Epilepsija je prisutna u 70 – 80 % bolesnica s Rettovim sindromom. Tipično bolesnici imaju uredan psihomotorički razvoj u prvim mjesecima života. Zatim dolazi do usporavanja razvitka grube motorike, smanjenog zanimanja za igru, lošijeg kontakta očima te progresivnog gubitka motoričkih vještina, govora i voljne funkcije ruku te razvoj karakterističnih, stereotipnih pokreta poput pranja, stiskanja, pljeskanja, uvrtanja, gotovo stalno prisutnih u budnom stanju. Prisutni su poremećaji disanja s hiperventilacijom ili zadržavanjem disanja do apneje u budnom stanju.

3. Hipoteza

Uporabom kombinacije klasičnih metoda analize kromosoma (GTG-pruganja, FISH) i najnovijih tehnika molekularne genetike (MLPA, aCGH) povećat će se stopa otkrivanja suptilnih kromosomskih aberacija uključenih u nastanak mentalnog zaostajanja nepoznate etiologije što će omogućiti definiranje novih fenotipova i molekularnog mehanizma koji je u njegovoj podlozi.

4. Ciljevi

Primarni cilj:

- definirati povezanost fenotipa i genotipa kod djece s mentalnim zaostajanjem u istočnoj Hrvatskoj.

Sekundarni ciljevi:

- otkriti potencijalne nove genotipove u podlozi mentalnog zaostajanja djece,
- precizno molekularno odrediti otkrivene kromosomske aberacije,
- utvrditi prevalenciju kromosomskih aberacija otkrivenih tehnikama klasične i molekularne citogenetike (GTG-pruganje, FISH) i tehnikama molekularne genetike (MLPA, aCGH, NGS),
- istražiti mehanizme u podlozi oštećenja kognitivnih funkcija,
- odrediti potencijalni mehanizam nasljeđivanja utvrđenih genotipova,
- otkriti moguće nove gene u podlozi mentalnog zaostajanja.

5. Materijali i metode

5.1. Etička načela

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra (KBC) Osijek i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Osijek. Identitet bolesnika bio je zaštićen.

Izrada doktorske disertacije je djelomično financirana institucijskim znanstvenim projektima Medicinskog fakulteta u Osijeku:

1. *„Utvrđivanje genetičkih uzroka mentalnog zaostajanja primjenom komparativne genomske hibridizacije na mikropostroju (VIF2016-MEFOS-29, voditelj: J. Wagner)“*
2. *„Etiologija mentalnog zaostajanja u pedijatrijskoj populaciji (VIF2015-MEFOS-11, voditelj: J. Wagner)“*

5.2. Ustroj studije

Opservacijsko presječno istraživanje obuhvatilo je 300 djece oba spola, među kojima je bilo 63,7 % muške i 36,3 % ženske djece od 0 do 18 godina života s MZ-om, urednog fenotipa i s dismorfijom, koja su pregledana, obrađena i praćena u Ambulanti za genetiku i na Odjelu za genetiku Klinike za pedijatriju KBC-a Osijek u razdoblju od 2008. do 2018. godine. Laboratorijska obrada uzoraka prikupljenih na Klinici za pedijatriju KBC-a Osijek provedena je u Laboratoriju za medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta Osijek kao i u suradnim laboratorijima u RH (*KB „Sveti Duh” Zagreb, KBC Rebro, Klinika za dječje bolesti Zagreb*) te u inozemstvu (*Klinični inštitut za medicinsko genetiko – UKC Ljubljana; Department of Neurobiology, Kavli Institute for Neuroscience, Yale University School of Medicine; Institut fur Humangenetik, Uniklinikum Jena, Deutschland*). U Laboratoriju za medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta Osijek napravljena je citogenetička analiza (GTG-pruganja i FISH). MLPA subtelomera kod 50 ispitanika napravljena je u Kliničkom institutu za medicinsku genetiku u Ljubljani. Molekularno-genetička analiza fragilnog X sindroma i Rett sindroma napravljena je u KBC Zagreb. aCGH napravljena je u Klinici za dječje bolesti Zagreb, KBC Zagreb, te KB “ Sveti Duh“ Zagreb i u Laboratoriju za medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta Osijek. Analiza višebojnog FISH-a je napravljena na institutu za humanu genetiku u Jeni, Njemačka. NGS je napravljen na Kavli institutu za neuroznanost na sveučilištu Yale.

5.3. Ispitanici

Kriteriji za uključenje ispitanika u istraživanje bili su:

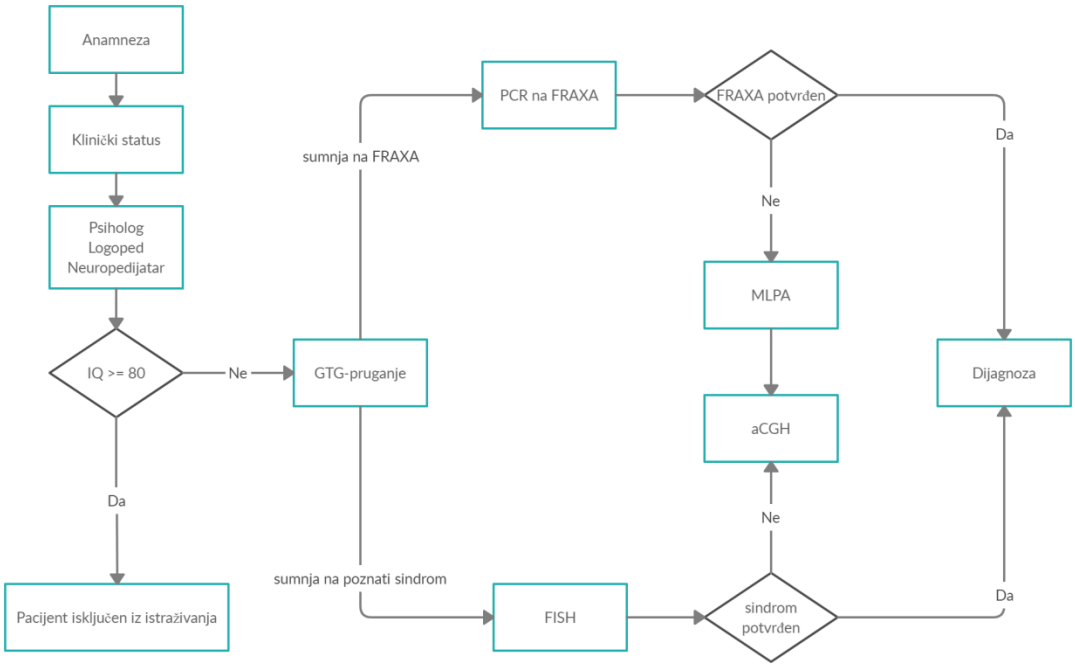
- mentalno zaostajanje
- dismorfija fenotipa/bez dismorfije fenotipa
- druge razvojne mane (ili bez njih) i motorički deficit

Isključujući su kriteriji bili:

- izolirani motorički deficit
- izolirani izostanak očekivanog govornog razvoja
- autizam

5.4. Materijali

5.4.1. Dijagnostički postupak kod ispitanika s mentalnim zaostajanjem



Slika 5.1. Hodogram dijagnostičkog postupka kod ispitanika (autorsko djelo)

5.4.2. Laboratorijske metode − klasična citogenetika i molekularna genetika

Krv za navedene analize uzorkovalo je kvalificirano medicinsko osoblje te je proslijeđena u Laboratorij za medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta Osijek kao i u suradne laboratorije u Republici Hrvatskoj te u inozemstvu. Krv je uzorkovana jednokratno, venepunkcijom u epruvete s antikoagulansom EDTA (za molekularno-genetičke pretrage) i epruvete s antikoagulansom Na-heparin (za citogenetičke pretrage). Po zaprimanju uzorci su u laboratoriju označeni jedinstvenim laboratorijskim brojem.

Kultivacija stanica periferne krvi, u svrhu izrade kariograma, napravljena je prema modificiranoj Moorheadovoj metodi iz 1960. Za izradu kariograma upotrijebljena je tehnika GTG-pruganja, a po potrebi i CTG-pruganja (u slučajevima sumnje na promjene u heterokromatinskim regijama). Tehnika GTG-pruganja uključuje 72-satnu inkubaciju stanica periferne krvi na 37 °C u odgovarajućem hranilištu, sinkronizaciju kulture u svrhu dobivanja prometafaznih kromosoma i prekid kulture dodatkom kolcemida, citostatika koji sprječava vezanje diobenog vretena. Nakon tretmana hipotoničnom otopinom stanice se fiksiraju, nekoliko puta properu te se izrađuju nativni preparati. Nakon sušenja nativni se preparat tretira proteolitičkim enzimom tripsinom te boja Giemsom. Tako se dobiju kromosomi sa specifičnim rasporedom pruga za svaki homologni par. Kromosomi se analiziraju pomoću svjetlosnog mikroskopa i digitalne kamere koja je spojena s odgovarajućim softverom (Cytovision, Applied imaging). U slučaju sumnje na neki od mikrodelecijskih sindroma, primijenjena je FISH-proba specifična za pojedinu regiju kromosoma (Prader-Willyjev, Angelmanov, Cri du chat, Wolf-Hirschhornov, 22q11.2 mikordelecijski sindrom itd.). Veličina je navedenih proba između 100 i 600 kb.

Izolacija genomske DNA iz pune krvi napravljena je prema standardnom protokolu proizvođača primjenom komercijalnih spin-kolona. Genomska DNA izolirana je iz 2 ml periferne venske krvi upotrebom komercijalnog kita prema protokolu proizvođača (QIAamp DNA Blood Midi Kit, Qiagen, Hilden, Germany). Uzorci krvi bili su pohranjeni na – 20 °C u laboratoriju te neposredno prije izolacije odmrznuti pri sobnoj temperaturi. Koncentracija i čistoća izolirane DNA svih ispitanika provjerena je Qubit fluorometrom iz 1 μl DNA izolata. Koncentracija DNA određena je temeljem apsorpcijske vrijednosti na 260 nm valne duljine, a izražena je u ng/μl, dok je čistoća DNA određena temeljem omjera valnih duljina DNA/proteini, odnosno 260/280 nm koji iznosi približno 1,8 te omjera DNA/soli (260/230 nm) koji iznosi 2,0 – 2,2.

MLPA analiza provedena je kod svih ispitanika analizom subtelomera specifičnim setom MLPA proba kako bi se otkrile kromosomske aberacije (SALSA MLPA probemix P036 SUBTELOMERES MIX1 i SALSA MLPA probemix P070 SUBTELOMERES MIX 2B prozvođača MRC – Holland (Amsterdam, The Netherlands)). Metoda otkrivanja duplikacija i delecija omogućava izvođenje analize standardnim protokolom proizvođača neovisno o upotrijebljenom setu proba (SALSA MLPA probemix). Sve MLPA probe razdvajaju se i otkrivaju kapilarnom elektroforezom na ABI 3500 genetičkom analizatoru (Applied Biosystems, Foster City, California, US). Dobiveni se podatci analiziraju Coffalyser programom ustupljenim od proizvođača (MRC – Holland). Upravo je interpretacija rezultata presudna u procjeni kvalitete korištenja MLPA analize u genetičkoj molekularnoj dijagnostici. Naime, homozigotne ili hemizigotne (prisutan samo jedan od dva parna kromosoma) delecije su jasno vidljive i mogu se interpretirati sa sigurnošću, dok interpretacija heterozigotnih duplikacija i delecija predstavlja izazov jer stvaraju različitu visinu pikova. Zbog olakšavanja interpretacije dobivenih rezultata, prema preporuci proizvođača, rade se po tri kontrole za svaku seriju od 5 uzoraka.

U istraživanju tehnikom aCGH upotrijebljen je oligonukleotidni kromosomski mikropostroj na platformi SurePrint G3 Unrestricted CGH ISCA v2 (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD). Format je platforme 8 x 60 K (18,851 ISCA regija + 40,208 proba raspoređenih u ostatku genoma). Prosječna je udaljenost proba 60 KB. Metoda omogućuje otkrivanje broja kopija u genomu, ali ne i mehanizam kojim su se te promjene dogodile. Tom metodom otkrivaju se promjene broja kopija (CNV) veličine manje od 10 kb. Primjenom CMA nije moguće otkriti nisku razinu mozaicizma, balansirane preraspodjele i točkaste mutacije. Nakon hibridizacije i skeniranja rezultati će se analizirati specifičnim softverom proizvođača CytoGenomics (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD) te su rezultat klasificiran kao:

1. patogeni – dobro poznati sindromi, *de novo* varijante i promjene >400 kb;

2. vjerojatno patogeni – nisu tako dobro opisani, *de novo* varijante, promjene >400 kb ili zahvaćaju klinički važne gene;

3. benigni – već opisani kod zdravih osoba i/ili naslijeđeni od zdravog roditelja;

4. vjerojatno benigni – oni koji nisu prethodno opisani, ali su naslijeđeni od zdravog roditelja;

5. varijanta nepoznatog kliničkog značenja (engl. *variants of uncertain clinical significance*, VOUS).

Da bi se izbjegla pojava prevelikog broja VOUS-a, odabrana je platforma odgovarajuće rezolucije (ne previsoke), a u slučaju da se VOUS pojavi, analizirat će se roditelji da bi se otkrilo je li riječ o naslijeđenoj ili *de novo* varijanti. Referentna (kontrolna) je DNA uzorak DNA koji je bez patoloških promjena i komercijalno je dostupan, a upotrijebljena je kontrolna muška i kontrolna ženska referentna DNA.

Metoda upotrijebljena za utvrđivanje broja tripleta CGG u genu *FMR1* i *MECP2* jest PCR/hibridizacija. Genotipizacija se provodi umnažanjem interesnih DNA fragmenata PCR-om, nakon čega slijedi analiza rezultata elektroforezom u agaroznom gelu i vizualizacija veličine umnoženih PCR fragmenata. Broj CGG tripleta određuje se prema molekularnom biljegu veličine. Ako se za ženske osobe dobije samo jedan fragment umjesto dvaju ili ako za muške osobe PCR fragment na gelu nije vidljiv, PCR se ponavlja s enzimom 7-deaza-dGTP nakon čega slijedi hibridizacija oligonukleotidnom sondom dig-5 (CGG) i određivanje broja CGG tripleta. U tablici 4.1.opisane su prednosti i nedostatci pojedinih metoda.

Tablica 5.1. Prednosti i nedostatci pojedinih laboratorijskih tehnika

Laboratorijska tehnika	**Prednosti**	**Nedostatci**
GTG-pruganje	Otkrivanje nebalansiranih i balansiranih kromosomskih aberacija	Dugotrajan postupak, mala rezolucija (5 do 10 Mb)
FISH	Otkrivanje nebalansiranih i balansiranih kromosomskih aberacija, mozaicizma, mikroduplikacija i mikrodelecija	Dugotrajan postupak, mala rezolucija (ovisi o veličini FISH-probe, 30 do 100 kb). Dobiva se informacija samo o regiji korištene FISH sonde
MLPA	Simultana analiza više uzoraka (do 50), višestruka tehnika umnažanja (u jednoj reakciji analiza više regija u genomu), niska cijena	Nemogućnost analize ciljanog genoma, osjetljivost na PCR inhibitore
aCGH	Analiza cijelog genoma, visoka rezolucija (do 40 kb)	Nemogućnost otkrivanja balansiranih kromosomskih aberacija i mozaicizma
PCR	Otkrivanje aberacija i točkastih mutacije	Mala optimizacija, zahtjeva poznati slijed nukleotida

FISH – fluorescentna *in situ* hibridizacija; MLPA − metoda višestrukog umnažanja vezanih sondi (prema engl. *Multiplex ligation-dependent probe amplification);* aCGH − komparativna genomska hibridizacija na mikropostorju (prema engl. *Microarray comparative genomic hybridization*); PCR − lančana reakcija polimerazom (prema engl. *Polymerase chain reaction*)

5.5. Statističke metode

Razlike u osnovnim obilježjima (npr. IQ, fenotip) s obzirom na spol i povijest umnog zaostajanja dodatno su ispitane pomoću hi-kvadrat testa (χ^2). Hi-kvadrat test temelji se na usporedbi očekivanih i opaženih frekvencija, a koristimo ga kada imamo frekvencije dvaju ili više nezavisnih uzoraka te želimo provjeriti razlikuju li se oni po mjerenim svojstvima. Pri tome je nužno zadovoljiti nekoliko uvjeta za njegovo korištenje, odnosno kada je broj stupnjeva slobode u kontingencijskim tablicama veći od 1 (npr. mjerena svojstva imaju više kategorija poput IQ od 50 – 55 do 70, od 35 – 49 do 50 – 55, od 20 – 25 do 35 – 40 te ispod 20), hi-kvadrat test se primjenjuje ako manje od 20 % ćelija ima očekivanu frekvenciju manju od pet, a niti jedna ćelija frekvenciju manju od jedan. Ukoliko uvjeti za hi-kvadrat nisu zadovoljeni koristio se Fisherov egzaktni test (npr. kod kontingencijskih tablica 2 x 2 ili ako više od 20 % ćelija ima očekivanu frekvenciju manju od 5). Prikupljeni podatci analizirani su statističkim programom za društvene znanosti (prema engl. *Statistical Package for Social Sciences*, SPSS) verzija 16.0. Vrijednosti dobivene u statističkoj analizi smatrane su značajnima ako su u području rizika manjem od 5 % ($P \leq 0{,}05$). Sve su *P* vrijednosti dvostrane.

6. Rezultati

Istraživanje je provedeno na ukupno 300 ispitanika s dijagnozom MZ-a (191 muških i 109 ženskih ispitanika) što donosi omjer od 1,75 : 1. U razdoblju od 2008 g. do 2018 g. u istočnoj Hrvatskoj je prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo (HZJZ) rođeno 78740 djece, i to u Osječko-baranjskoj županiji 29873, Vukovarsko-srijemskoj županiji 16645, Brodsko-posavskoj županiji 16272, Požeško-slavonskoj županiji 7511 i Virovitičko-podravskoj 8439 djece. Broj ispitanika i dobne skupine su prikazane u tablici 6.1., a u tablici 6.2. prikazani su rezultati psihologijske i logopedske obrade ispitanika s MZ-om.

Tablica 6.1. Dob u trenutku postavljanja dijagnoze i spol ispitanika s mentalnim zaostajanjem

Spol		**Dječaci** ***n*** **= 191** **(%)**	**Djevojčice** ***n*** **= 109** **(%)**	**Ukupno** ***n*** **= 300** **(%)**
Dob dijagnoze	0 − 1 godina	38 (19,9 %)	32 (29,4 %)	70 (23,3 %)
	1 − 10 godina	137 (71,7 %)	70 (64,2 %)	207 (69 %)
	10 − 18 godina	16 (8,4 %)	7 (6,4 %)	23 (7,6 %)

Tablica 6.2. Nalaz psihologijske i logopedske obrade ispitanika s mentalnim zaostajanjem

	Usporen jezično - govorni razvoj	**Zakašnjeli jezično-govorni razvoj**	**Izostanak razvoja govora**	**IQ 50 − 69[1]**	**IQ 35 − 49[2]**	**IQ 20 − 34[3]**	**IQ <20[4]**
Dječaci	124 (66,3 %)	54 (58,1 %)	13 (65 %)	120 (64,8 %)	40 (60,6 %)	23 (65,7 %)	8 (57,1 %)
Djevojčice	63 (33,7 %)	39 (41,9 %)	7 (35 %)	65 (35,1 %)	26 (39,4 %)	12 (34,3 %)	6 (42,9 %)
Ukupno	187 (62,3 %)	93 (31 %)	20 (6,7 %)	185 (61,7 %)	66 (22,0 %)	35 (11,7 %)	14 (4,7 %)

[1]Lako mentalno zaostajanje; [2]Umjereno mentalno zaostajanje; [3]Teško mentalno zaostajanje; [4]Duboko mentalno zaostajanje

U tablici 6.3. navedeni su prenatalni i postnatalni čimbenici rizika koji mogu utjecati na mentalno zaostajanje kod ispitanika. U tablici 6.4. prikazana je dob roditelja ispitanika s mentalnim zaostajanjem.

Tablica 6.3. Čimbenici rizika ispitanika s mentalnim zaostajanjem

	IUGR[1]	**Nedonošenost**	**Asfiksija**	**Infekcija[2]**	**Lijekovi u trudnoći[3]**
Broj ispitanika	33 (11 %)	65 (21,7 %)	26 (8,7 %)	3 (1 %)	6 (2 %)

[1]IUGR − intrauterini zastoj u rastu (prema engl. *Intrauterine growth restriction*); [2]TORCH infekcije − infekcija uzrokovana citomegalovirusom, virusom rubella, toxoplasmom gondii i HSV1/2; [3]Antipsihotici, antidepresivi

Tablica 6.4. Dob roditelja u vrijeme rođenja ispitanika s mentalnim zaostajanjem

Dob (godine)	**Majka**	**Otac**
<20	7 (2,3 %)	0 (0 %)
20 – 29	115 (38,3 %)	87 (29 %)
30 – 39	133 (44,3 %)	156 (52 %)
40 – 50	45 (15 %)	54 (18 %)
>50	0 (0 %)	3 (1 %)

Ukupan broj pozitivnih nalaza kod ispitanika s mentalnim zaostajanjem prema korištenim metodama (GTG-pruganje, FISH, MLPA, CMA, PCR, NGS) prikazan je u tablici 6.5.

Tablica 6.5. Ukupan broj pozitivnih nalaza prema korištenim metodama

Ukupno analizirano	**GTG (300)**	**FISH[1] (29)**	**MLPA[2] (50)**	**CMA (27)**	**PCR[3] (126)**	**MLPA[4] (3)**	**NGS[5] (2)**	**PCR-STR[6] (1)**
Numeričke aberacije	74	-	-	-	-	-	-	-
Strukturne aberacije	13	-	-	-	-	-	-	-
Mikrodelecije	-	17	2	2	-	-	-	1
Mikroduplikacije	-	-	2	3	-	-	-	-
Mutacije	-	-	-	-	11	3	2	-
Ukupno	87	17	4	5[a]+ 7[b]	11	3	2	1

[1]FISH probe korištene za poznate lokuse (D22S75, ELN, SNRPN, WHSCR)

[2]SALSA MLPA probemix P036 Subtelomeres MIX 1 i SALSA MLPA probemix P070 Subtelomeres Mix 2B (proizvođač MRC – Holland, Amsterdam, The Netherlands)

[3]PCR metoda broja ponavljajućih CGG tripleta za dijagnozu fragilnog X sindroma

[4]SALSA MLPA probemix P015 MECP2 (proizvođač MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands); utvrđena mutacija u genu *MECP2*(c.1330G>A;813_837dup25)

[5]Sanger sekvencioniranje korišteno kod detekcije obiteljskog MZ-a i mikrocefalije, utvrđena mutacija u genu *SMCA1* (c.1235G>A; p.Arg412GIn)

[6]Analiza mikrosatelitnih lokusa (FEP/FPS, D15S659, D15S642, D15S541, D15S18, D15S11, D15S542, D15S1035, D15S211, D15S131) kojom je potvrđen PWS-UPD

[a] Patogeni nalazi utvrđeni CMA metodom

[b] VOUS i benigni nalazi utvrđeni CMA metodom

GTG-pruganjem je utvrđen najveći broj pozitivnih nalaza kod sumnje na fenotipski poznate sindrome. FISH metodom je utvrđen veći broj poznatih mikrodelecijskih sindroma negoli metodom aCGH, no u istraživanju je aCGH bila metoda izbora za ispitanike s nepoznatim fenotipom. Metodom MLPA subtelomera utvrđen je mali broj pozitivnih nalaza kod ispitanika s mentalnim zaostajanjem. Ostale metode (PCR metoda korištena u dijagnostici FRAXA,

MLPA u dijagnostici Rettovog sindroma) su se pokazale učinkovitima u dijagnosticiranju sindroma.

Prikaz broja ispitanika s mentalnim zaostajanjem kod kojih su utvrđeni poznati sindromi metodama GTG-pruganja i FISH nalazi se u tablici 6.6.

Tablica 6.6. Broj ispitanika s poznatim sindromima utvrđeni GTG-pruganjem i FISH metodom

DS	ES	PS	TS	KS	XXX	CdCS	WHS	DGS	PWS	AS	WBS
62/62	2/2	1/1	2/5	5/10	2/5	4/4	2/2	4/8	4/10	½	2/3

DS − Downov sindrom; ES − Edwardsov sindrom; PS − Patauov sindrom; TS − Turnerov sindrom; KS – Klinefeterov sindrom; XXX − Trostruki X sindrom; CdCS − Cri du Chat sindrom; WHS − Wolf-Hirschhornov sindrom; PWS − Prader-Willijev sindrom; AS − Angelmanov sindrom; WBS − Williams-Beurenov sindrom

Rezultati utvrđeni MLPA za subtelomere kod ispitanika koju su uz mentalno zaostajanje imali i dismorfiju fenotipa i epilepsiju prikazani su u tablici 6.7.

Tablica 6.7. Aberacije kod ispitanika s mentalnim zaostajanjem utvrđenih analizom MLPA subtelomera korištenjem proba P036 i P070

MLPA[1]	**aCGH nalaz[2]**
dup 21q22.3 (P036)	21q22.3(48056401 − 48084156)[3]
del 19q13.43 (P070)	Nije potvrđena delecija
del 19q13.43(P070)	Nije potvrđena delecija
dup 15q11.2 (P070 i P036)	Nije potvrđena duplikacija

[1]MLPA rezultat i probe kojima je utvrđena aberacija; [2]aCGH − komparativna genomska hibridizacija na mikropostroju, korištena kao metoda za potvrdu/isključivanje aberacije utvrđene MLPA analizom; [3]aCGH analiza je pokazala mikroduplikaciju u regiji 21q22.3 veličine 27,7 kb koja je vjerojatno benigna

Rezultati komparativne genomske hibridizacije na mikropostroju prikazani su u tablicama 6.8. i 6.9. Ispitanici kod kojih su utvrđene aberacije su uz mentalno zaostajanje imali i dismorfiju fenotipa, zaostajanje u tjelesnom razvoju i epilepsiju.

Tablica 6.8. Patogene promjene utvrđene metodom komparativne genomske hibridizacije na mikropostroju kod ispitanika s mentalnim zaostajanjem

aCGH nalaz	Veličina promjene
17p13.1(7512573_8019071)x3 mat[1]	506,5 kb
17p13.1(7512573_8019071)x3 mat[1]	506,5 kb
7q11.22(70017352_70189959)x1[2]	172,6 kb
16p13.11p11.2(16,525,289-28,318,164)x4[3]	11,8 Mb
17q12(34856055_36248918)x3[4]	1,39 Mb

[1]aCGH analiza je pokazala tri kopije genoma u regiji 17p13.1 veličine 506,5 kb majčinog podrijetla;

[2]aCGH analiza je pokazala novonastalu deleciju veličine 172,6 kb u regiji 7q11.22;

[3]aCGH analiza je pokazala četiri kopije u regiji 16p13.11p11.2 veličine 11.8 Mb. Promjena je novonastala;

[4]aCGH analiza je pokazala tri kopije genoma veličine 1,44 Mb veličine 1,39 Mb u regiji 17q12

Tablica 6.9. Varijante nepoznatog kliničkog značenja i benigne promjene utvrđene metodom komparativne genomske hibridizacije na mikropostroju kod ispitanika s mentalnim zaostajanjem

aCGH nalaz	Veličina promjene	Značenje promjene
1p13.3(108332063_108739610)x3 pat	407,5 kb	VOUS[1]
21q22.3(48056401_48084156)	27,7 kb	Vjerojatno benigna
1p35.3(28742683_28961074)x1	218 kb	VOUS
1p31.1(71504641_71876032)x1	371 kb	Vjerojatno benigna
16p13.3(5937863_6199920)x3	262 kb	Vjerojatno benigna
15q26.3(99389036_99435876)x1	465,8 kb	VOUS
10q24.32(103436184_104040469)x1, 11p14.1p13(29634061_31118086)x3,21q22.3(48016846_48056450)x1	604 kb;1484 kb;39,6 kb	VOUS
12p13.33(1555573_2998250)x3	1,44 Mb	Vjerojatno benigna

[1]VOUS − varijanta nepoznatog kliničkog značenja (engl. *variants of uncertain clinical significance*); Mb − megabaza; kb − kilobaza

Popis gena kandidata utvrđen određivanjem točaka loma FISH metodom i metodom aCGH povezanih sa MZ-om kod ispitanika prikazan je u tablici 6.10.

Tablica 6.10. Popis gena kandidata povezanih s mentalnim zaostajanjem kod ispitanika s mentalnim zaostajanjem

OMIM simbol gena	**Pozicija gena**
AUTS2 (*607270)	7q11.22
GRIN2 (*138253)	16p13.2
KDM6B (*611577)	17p13.1
LHX 1(*601999)	17q12
SMC1A (*300040)	Xp11.2
SOX11 (*600898)	13q34
MECP2 (*300005)	Xq28
ZNF385B (*612344)	2q31.2-q31.3
SHANK3 (*606230)	22q13.33
BRPF1 (*602410)	3p25.3
WBSCR17 (*615137)	7q11.22
NDE1 (*609449)	16p13.11
COMT (*116790)	22q11.21
ARVCF (*602269	22q11.21
TNKS (*603303)	8p23.1
SETD5 (*615743)	3p25.3
CDK6 (*603368)	7q21.2
PCDH15 (*605514).	10q21.1
SLC5A11 (*610238)	16p12.1
CACNG3 (*606403)	16p12.1
WAC (*615049)	10p12.1

OMIM − McKusickov katalog mendelski nasljednih bolesti (prema engl. *Online Mendelian Inheritance in Man*); p-kratki krak kromosoma; q − dugi krak kromosoma; *AUTS2* − kandidatni gen za autizam (prema engl. *Autism, susceptibility to, 2*)*; GRIN2A* − receptor glutamata, ionotropski, n-metil-d-aspartat, podjedinica 2a (prema engl. *G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 2*); *KDM6B*-lizin specifična demetilaza 6B (prema engl. *Lysine-specific demethylase 6b*); *LHX1* − lim homebox gen 1 (prema engl. *Lim homeobox gene 1*); *SMC1*− gen za strukturno održavanje proteina kromosoma (prema engl. *Structural maintenance of chromosomes 1a*); *SOX11* − SRY gen HMG box skupine (prema engl. *Sry-related hmg-box gene 11*)*; MECP2* − metil-cpg vezajući protein (prema engl. *Methyl-cpg-binding protein 2*); *ZNF385B* − protein cink prsta 385 (prema engl. *Zinc finger protein 385*); *SHANK3* − SH3 i višestruke domene ponavljanja anikrina (prema engl. *Sh3 and multiple ankyrin repeat domains 3*); *BRPF1* − bomo domena i protein PHD-prsti (prema engl. *Bromodomain- and phd finger-containing protein*); *WBSCR17* − WBS kromosomska regija 17 (prema engl. *Williams-Beuren syndrome chromosome region 17*); *NDE* − protein za neurorazvoj 1 (prema engl. *Nude neurodevelopment protein 1*)*; COMT* − (prema engl. *Catechol-o-methyltransferase*); *ARVCF* − prema engl. *Armadillo repeat protein deleted in velo-cardio-facial syndrome); TNKS* − Poli (ADP-riboza) polimeraza-1 (prema engl. *Trf1-interacting, ankyrin-related adp-ribose polymerase*); *SETD5* − prema engl. *Set domain-containing protein 5; CDK6* − kinaza ovisna o ciklinu (prema engl. *Cyclin-dependent kinase 6*); *PCDH15* − prema engl. *Protocadherin 15*; *SLC5A11* − superobitelji nosača otopljenih tvari SLC (prema engl. *Solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter*); *CACNG3* − kalcijski kanal ovisan o naponu, gama 3 podjedinica (prema engl. *Calcium channel, voltage-dependent, gamma-3 subunit*); *WAC* − prema engl. WW domain-containing adapter.

6.1. Aberacije utvrđene GTG-pruganjem kod ispitanika s mentalnim zaostajanjem

GTG-pruganje kromosoma provedeno je kod svih 300 ispitanika s dijagnozom MZ-a. Normalan kariotip je u utvrđen kod 71 % (213/300) ispitanika. Kod 29 % ispitanika (87/300) otkrivene su kromosomske aberacije, od čega su numeričke aberacije utvrđene u 85 % ispitanika (74/87), od čega su kod 9 ispitanika bile vezane uz spolne kromosome. Strukturne aberacije su utvrđene kod 15 % (13/87) ispitanika. Patološki kariotipovi su prikazani u tablicama 6.11. i 6.12.

Tablica 6.11. Kromosomski poremećaji utvrđeni kod ispitanika s mentalnim zaostajanjem

Nalaz kariotipa
46,XX,der(14;21)(q10;q10)+21mat
46,XY, +21,der(21;21)(q10;q10)dn
46,XY,+21,der(21;21)(q10;q10)dn
46,XY,der(14;21)(q10;q10)+21dn
47,XX,+21,der(21;21)(q10;q10)der(21;21)(p10;p10)(71)/46,XX,der(21;21)(q10;q10)der(21;21)(p10;p10)(29)
48,XXY,+21
47,XX,+13
47,XX,+18
45,X
47,XXY
47,XXX
47,XX,+der(22),t(X;22)(q28;q11.2)mat
47,XX,+mar?dn[38]/46,XX,1qh+pat[62]
46,XX,der(2),t(2;4)(p25.1;q31.3)pat
46,XY,del(2)(q31q33)
46,XY,r(22)dn
46,XY,der(8)t(4;8)(p16.1;p23.1)
46,XX,der(4)t(4;13)(q33;q14.1)mat
46,XX,t(6;10)(q16.1;q21.1)pat
46,XY,t(9;22)(q34.3;q12)dn
46,XY,t(7;9)(q21.2;q13)pat
46,XY,del3(p25)dn
46,XY,der(1)t(10;11;1)(10pter→10p11.2::11q25→11q23::1p34.3→1qter)mat,der(11)t(1;11)(p34.3;q23)mat,t(18;19)(q23;p13.3)dn

pat − očinsko porijeklo promjene; mat − majčinsko porijeklo promjene; dn − novonastala promjena; p − kratki krak kromosoma; q − dugi krak kromosoma; pter − terminalni krak kratkog kromosoma; qter − terminalni krak dugog kromosoma; der − derivirani kromosom; t − translokacija; qh − heteromorfizam kromosoma; mar − marker kromosom; r − prstenasti kromosom (prema engl. *ring chromosome*)

6.1.1. Fenotip i genotip ispitanika s numeričkim aberacijama utvrđenim GTG pruganjem

Od numeričkih aberacija najviše je bio zastupljen regularni tip DS (57/62). Translokacijski tip DS-a je utvrđen kod 4 ispitanika. U jednom slučaju je utvrđen ženski kariotip: 47,XX,+21,der(21;21)(q10;q10)der(21;21)(p10;p10)(71)/46,XX,der(21;21)(q10;q10) der(21;21)(p10;p10)(29)dn. Riječ je o mozaičnom kariotipu s dvije stanične linije. U 71 % stanica utvrđen je translokacijski tip trisomije 21 kod koje je jedan normalan kromosom 21 zamijenjen s dvama deriviranim kromosomima; jednim koji se sastoji od dva duga kraka kromosoma 21 te drugim koji se sastoji od dva kratka kraka kromosoma 21. U 29 % stanica utvrđen je kariogram u kojem su oba normalna kromosoma 21 zamijenjena dvama deriviranim kromosomima od kojih se prvi sastoji od dva duga kraka kromosoma 21, a drugi od dva kratka kraka kromosoma 21. Opisane promjene u kariotipu su novonastale. Spol, čimbenici rizika i komorbiditeti ispitanika s DS-om prikazani su u tablicama 6.12. i 6.13.

Tablica 6.12. Broj ispitanika po spolu i perinatalni čimbenici ispitanika s Downovim sindromom

Spol	***n* (%)**
Žensko	30 (48,4 %)
Muško	32 (51,6 %)
Perinatalni čimbenici	
IUGR[1]	4 (6,5 %)
Nedonošenost	18 (29 %)
Asfiksija	11 (17,7 %)

[1]IUGR − intrauterini zastoj u rastu (prema engl. *Intrauterine growth restriction*)

Tablica 6.13. Komorbiditeti ispitanika s Downovim sindromom

Komorbiditeti	***n* (%)**
Srčana greška	33 (53 %)
Hirschprungova bolest	3 (4,8 %)
Hipotiroidizam	20 (32,2 %)
Anomalije urinarnog sustava	4 (6,5 %)
Anularni pankreas	1 (1,6 %)
Stenoza dvanaesnika	1 (1,6 %)
Trombocitopenija	5 (8,1 %)
Epilepsija	3 (4,8 %)
Leukemija	1 (1,6 %)

Kod dva ispitanika je utvrđen regularni tip trisomije 18 (Edwardsov sindrom). Oba ispitanika su ženskog spola sa karakterističnom facijalnom dismorfijom. Jedan ispitanik ima prirođenu srčanu grešku – ventrikularni septalni defekt (VSD) i epilepsiju, te izrazito teško psihomotoričko zaostajanje. Drugi ispitanik je teško psihomotorički zaostao, bez drugih komorbiditeta.

Patauov sindrom utvrđen je kod ispitanika ženskog spola. Fenotip uključuje karakterističnu dismorfiju lica, heksdaktiliju, izrazito teško psihomotoričkim zaostajanjem i prirođenu srčanu grešku (VSD).

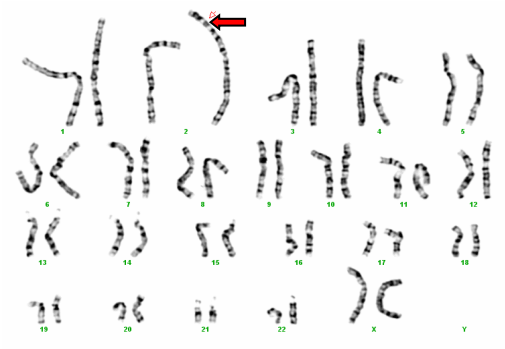
Kod pet ispitanika utvrđen je Klinefelter sindrom. Svi ispitanici imaju lako mentalno zaostajanje bez pridruženih komorbiditeta.

Kod dva ispitanika utvrđen je Turnerov sindrom. Jedan ispitanik ima umjereno mentalno zaostajanje, usporen razvoj govora, priođenu srčanu grešku (VSD), te perinatalne čimbenike rizika koji uključuju IUGR, nedonošenost i asfiksiju. Drugi ispitanik je karakterističnog fenotipa sa usporenim razvojem govora i lakim MZ-om bez pridruženih komorbiditeta.

Kod dva ispitanika utvrđen je sindrom trostrukog X kromosoma. Jedan ispitanik ima usporen razvoj govora i lako MZ, bez pridruženih komorbiditeta. Drugi ispitanik ima usporen razvoj govora bez drugih komorbiditeta.

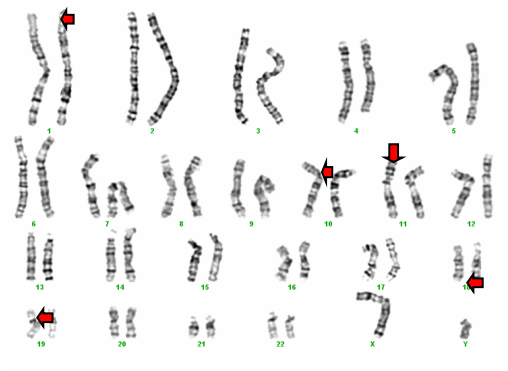
6.1.2. Fenotip i genotip ispitanika sa strukturnim aberacijama utvrđenim GTG-pruganjem

Ispitanik 1 je ženskog spola, bez perinatalnih čimbenika rizika s lakim MZ-om, usporenim razvojem govora i dismorfijom fenotipa koja uključuje nizak rast kose na vratu, širok nosni korijen, nisko položene uške, spojene obrve, široki razmak između očiju, epikantalne nabore, mikrognatiju, nepravilan rast zubi, kratke prste, klinodaktiliju. Utvrđen je kariotip 46,XX,der(2)t(2;4)(p25.1;q31.3)pat (slika 6.1.). Nalaz je potvrđen FISH analizom primjenom telomerne probe za kratki krak kromosoma 2 (Tel2p) i telomerne probe za dugi krak kromosoma 4 (Tel4q).

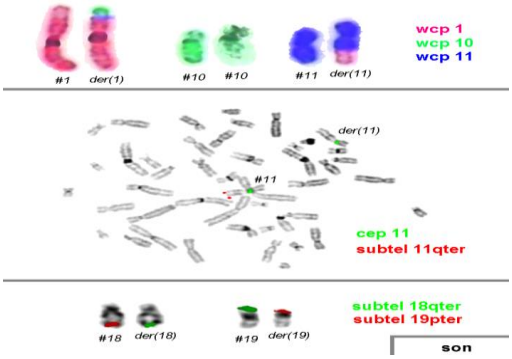


Slika 6.1. Kariogram ispitanika 1. Kariotip: 46,XX,der(2),t(2;4)(p25.1;q31.3)pat. Riječ je o ženskom kariotipu s deriviranim kromosomom 2 kao posljedicom translokacije 2;4 očeva podrijetla (strelica). Izvor: fotografija iz arhive Laboratorija za medicinsku genetiku pri Medicinskom fakultetu Osijek.

Ispitanik 2 je muškog spola s perinatalnim čimbenicima rizika koji uključuju nedonošenost i asfiksiju. Umjereno je mentalno zaostao, ima zakašnjeli razvoj govora i dismorfiju fenotipa koja uključuje visoko čelo, egzoftalmus, epikantalne nabore, sedlast nosni korijen, visok svod nepca, mikrognatiju, široka usta, nepravilan rast zuba, nizak rast kose na vratu, nisko položene uške, dvostruki ureter. Utvrđen je muški kariotip koji uključuje kompleksna strukturna razmiještanja 46,XY,der(1)t(10;11;1)(10pter→10p11.2::11q25→ 11q23::1p34.3→1qter)mat,der(11)t(1;11)(p34.3;q23)mat,t(18;19)(q23;p13.3)dn (slika 6.2.). FISH-em je potvrđen kompleksni kromosomski razmještaj (slika 6.3.).



Slika 6.2. Kariogram ispitanika 2. Kariotip 46,XY,der(1)t(10;11;1)(10pter→10p11.2::11q23::1qter)mat, der(11)t(1;11)(p34.3;q23)mat,t(18;19)(q23;p13.3)dn. Riječ je o muškom kariotipu koji sadrži derivirani kromosom 11 koji uključuje kromosome 10;11;1 naslijeđene od majke (strelica). Recipročna je translokacija 18;19 *de novo* (strelica). Riječ je o nebalansiranom kariotipu s posljedičnom delecijom kromosomskog segmenta 11p25->qter i duplikacijom 10pter->10p11.2. Izvor: fotografija iz arhive Laboratorija za medicinsku geneitku pri medicinskom fakultetu Osijek.



Slika 6.3. Potvrda kromosomske aberacije FISH metodom kod ispitanika 2. *Fluorescentna in situ hibridizacija* primjenom proba za centromere 11, 18, subtelomere (11qter, 18qter, 19 qter) i kromosom specifične probe (wcp)-1, 10, 11 pokazuje translokaciju telomerne regije 19p na telomerni kraj q kraka kromosoma 18. Izvor: fotografija iz arhive Laboratorija za medicinsku genetiku pri Medicinskom fakultetu Osijek.

Ispitanik 3 je ženskog spola s perinatalnim čimbenicima rizika koji uključuju nedonošenosti i IUGR. Fenotip uključuje teško psihomotoričko zaostajanje, dismorfiju lica (mikrocefalija, hipertelorizam, epikantalni nabori, mala usta, nepravilan rast zub, visok svod nepca, mikrognatija, loše oblikovane uške, duge i tanke prste na rukama obostrano, klinodaktilija, nepravilni dermatoglife), nizak rast, zaostali tjelesni razvoj i epilepsiju. Citogenetska analiza pokazala je kariotip 47,XX,+der(22)t(X;22)(q28;q11.2)mat (slika 6.4). Primjenom FISH-proba specifičnih za regije na kromosomima 22 i X (LSI N25 – 22q11.2, LSI SHANK3 – 22q13.3, CEP X- DXZ1, Xqter – MS607), utvrđen je derivirani kromosom koji se sastoji od regije kromosoma 22 (22pter→22q11.2) i X kromosoma (Xq28→Xqter).

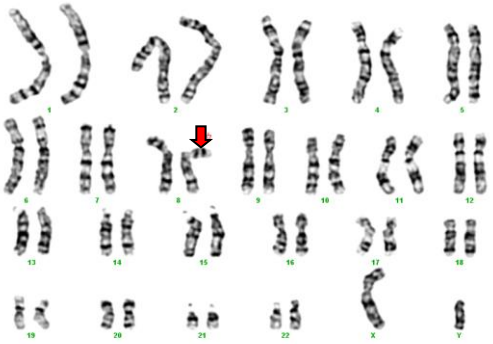


Slika 6.4. Kariogram ispitanika 3. Kariotip 47,XX,+der(22),t(X;22)(q28;q11.2)mat. Riječ je o ženskom kariotipu s utvrđenim derivirani kromosom om 22 (strelica) koji se sastoji od regije kromosoma 22 (22pter→22q11.2) i X kromosoma (Xq28→Xqter) naslijeđenim od majke. Izvor: fotografija iz arhive Laboratorija za medicinsku genetiku pri Medicinskom fakultetu Osijek.

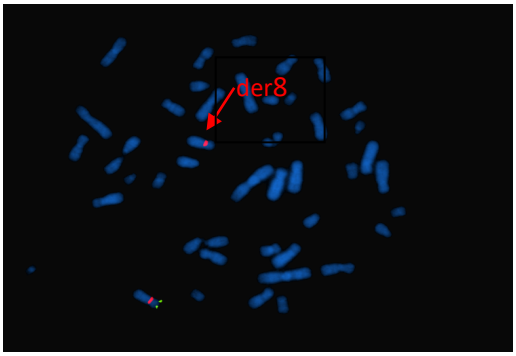
Ispitanik 4 je muškog spola sa perinatalim čimbenicima rizika koji uključuju asfiksiju i IUGR. Fenotip uključuje teško psihomotoričko zaostajanje, dismorfiju lica (mali opseg glave, uzak očni rasporak, male oči, kolobom šarenice, gomoljast vrh nosa, mala usta, rascjep mekog i tvrdog nepca, nisko položene uške), hipoplastičan prsni koš, kratke prste, savijeni treći i četvrti prst na rukama, spojen treći i četvrti prst na nogama, nerazvijen drugi prst na desnoj nozi. Ima prirođenu srčanu grešku – otvoren duktus arteriozus i anomalije urogenitalnog sustava. Utvrđen je kariotip 46,XY,del(2)(q31q33). Riječ je o muškom kariotipu s intersticijskom delecijom segmenta 2q31-2q33. Kariotip majke je normalan, uzorak periferne krvi oca nije dostupan za citogenetsku analizu te nije moguće odrediti podrijetlo strukturne kromosomske promjene.

Ispitanik 5 je urednog fenotipa bez perinatalnih čimbenika rizika, sa umjerenim MZ-om. Utvrđen je kariotip 46,XY,r(22)dn. Primjenom FISH-proba specifičnih za regije kromosoma 22 (22q11.2, 22q12, 22qter) utvrđena je delecija 22q13 i novonastali prstenasti kromosom 22.

Ispitanik 6 je muškog spola bez perinatalnih čimbenika rizika. Fenotip uključuje umjereno MZ i dismorfiju lica (mikrocefalija, nizak rast kose na čelu, hirzutizam, širok nosni korijen, anteverzija nosnica, loše oblikovane i nisko položene uške, mikrognatija) i prirođenu srčanu grešku (VSD). Utvrđen je kariotip 46,XY,der(8)t(4;8)(4pter→4p16.1::8p23.1→8qter)dn (slika 6.5.). Primjeno lokus specifičnih FISH proba 4p16.3, centromera 4, centromera 8 i subtelomera 8p (WHSC1, CEP4, CEP8) utvrđena je segmentalna trisomija (4pter-p16.1) i segmentalna monosomija terminalne regije kromosoma 8 (8pter-p23.1) (slika 6.6.).



Slika 6.5. Kariogram ispitanika 6. Kariotip 46,XY,der(8)t(4;8)(4pter→4p16.1::8p23.1→8qter)dn. Radi se o muškom kariotipu s deriviranim kromosomom 8 koji sadrži segment 4pter-4p16.1 te segment 8p23.1-8qter (strelica). Izvor: fotografija iz arhive Laboratorija za medicinsku genetiku pri Medicinskom fakultetu Osijek.



Slika 6.6. Potvrda kromosomske aberacije FISH metodom kod ispitanika 6. *Fluorescentna in situ hibridizacija* primjenom lokus specifilnih proba na centromeru 8 i subtelomeru 8p (CEP8) utvrđena je segmentalna monosomija terminalne regije kromosoma 8 (8pter-p23.1). Izvor: fotografija iz arhive Laboratorija za medicinsku genetiku pri Medicinskom fakultetu Osijek.

Ispitanik 7 je ženskog spola s umjerenim MZ-om, usporenim psihomotoričkim razvojem, zaostajanjem u rastu i dismorfijom fenotipa koji uključuje hipertelorizam, mikroretrognatiju, nisko položene i loše oblikovane uške. Od pridruženih anomalija ima dilatacijsku kardiomiopatiju. Kod ispitanika je utvrđen mozaičan ženski kariotip 47,XX,1qh+pat,+mar?dn[38]/46,XX,1qh+pat[62]. U 62 % analiziranih stanica utvrđen je normalan ženski kariotip s heteromorfizmom kromosoma 1 (46,XX,1gh+pat), a navedena varijanta naslijeđena je od oca. U 38 % analiziranih stanica utvrđen je ženski kariotip s prekobrojnim marker kromosomom i heteromorfizmom kromosoma 1 (47,XX,1gh+pat,+mar?dn). Nađeni marker kromosom je novonastao. Primjenom FISH proba (cenM-FISH i subcenM-FISH za kromosom 5) utvrđeno je da se radi o deriviranom kromosomu 5 koji sadrži kromosomske regije p1?4→q11.1, odnosno da marker kromosom sadrži i heterokromatinski i eukromatinski materijal.

Ispitanik 8 je muškog spola s lakim MZ-om, hipotonijom i dismorfijom fenotipa. Kod ispitanika 8 utvrđen je muški kariotip 46,XY,del3(p25)dn. Riječ je o muškom kariotipu sa 46 kromosoma koji pokazuje segmentalnu monosomiju 3p25-pter. Promjena je novonastala.

Ispitanik 9 je ženskog spola sa teškim psihomotoričkim zaostajanjem, dismorfijom fenotipa (mikrocefalija, mikroftalmija, arahnodaktilija, rascjep tvrdog nepca, loše oblikovane uške), malformacijom srca i bubrega i epilepsijom. Kariotip je 46,XX der(4)t(4;13)(q33;q14.1)mat. Riječ je o nebalansiranom ženskom kariotipu s gubitkom kromosomskog segmenta 4q33qter i suviškom kromosomskog segmenta 13q14.1qter naslijeđenog od majke.

Ispitanik 10 ima umjereno MZ i dismorfiju fenotipa koja uključuje mali opseg glave, širok korijen nosa, visok svod nepca, prirođenu srčanu grešku (VSD). Utvrđen je kariotip 46,XX,t(6;10)(q16.1;q21.1)pat. Riječ je o ženskom kariotipu s 46 kromosoma i recipročnom translokacijom između kromosoma 6 i 10 (točke loma 6q16.1 i 10q21.1). Uvidom u kariotipove roditelja utvrđeno je očinsko porijeklo ove kromosomske promjene (otac je također nositelj recipročne translokacije 6;10). Primjenom FISH proba (DGSII, D10Z1 i ASP6q) potvrđen je nalaz GTG-pruganja.

Ispitanici 11 i 12 su muškog spola s umjerenm MZ-om, hipotonijom i dismorfijom fenotipa koji uključuje brahicefaliju, izbočene frontalne tubere, hipertelorizam, epikantalne nabore, sinofris, niže položene uške, anteverziju nosnica, gotsko nepce i nizak rast kose na vratu. Utvrđen je kariotip 46,XY,t(9;22)(q34.3;q12)dn. Riječ je o muškom kariotipu s 46 kromosoma i balansiranom recipročnom translokacijom između dugih krakova kromosoma 9 i 22. Primjenom FISH proba (ABL1, VIJ2yRM2241, MS607, BCR, TBX1) utvrđena je translokacija telomerne regije 9q na dugi krak kromosoma 22, translokaciju telomerne regije 22q na dugi krak kromosoma 9 te normalne hibridizacijske uzorke za kromosomske regije 22q11.2 i 9q34.1.

Ispitanik 13 je muškog spola s lakim MZ-om, usporenim razvojem govora i urednim fenotipom. Utvrđen je kariotp 46,XY,t(7;9)(q21.2;q13)pat. Riječ je o muškom kariotipu s 46 kromosoma i balansiranom recipročnom translokacijom između kromosoma 7 i 9. Promjena je očinskog porijekla.

6.2. Mikrodelecijski sindromi kod ispitanika s mentalnim zaostajanjem

Ukupno je utvrđeno 18 ispitanika s fenotipski poznatim mikrodelecijskim sindromima. Utvrđeno je četiri ispitanika s DiGeorgeovim sindromom, pet ispitanika s Prader-Willijevim sindrom, dva ispitanika s Williams-Beurenovim sindromom, četiri sa Cri du Chat sindromom, dva s Wolf-Hirschorrnovim sindromom i jedan s Angelmanovim sindromom. U tablicama 6.14., 6.15., 6.16., 6.17. i 6.18. prikazani su čimbenici rizika, komorbiditeti ispitanika i nalazi logopeda i psihologa.

Tablica 6.14. Prenatalni čimbenici rizika i obilježja ispitanika s DiGeorgeovim sindromom

	Ispitanik14	**Ispitanik15**	**Ispitanik16**	**Ispitanik17**
IUGR[1]	Ne	Ne	Ne	Ne
Asfiksija	Ne	Da	Ne	Ne
Nedonošenost	Da	Ne	Ne	Ne
Srčana greška	Da[2,3]	Da[2]	Da[4]	Ne
Imunodeficijencija	Ne	Da	Ne	Ne
Hipoparatiroidizam	Ne	Ne	Ne	Da
Gluhoća	Da	Da	Ne	Ne
Mentalno zaostajanje	Lako	Umjereno	Umjereno	Lako
Jezično-govorni razvoj	Usporen	Usporen	Usporen	Usporen

[1]IUGR − intrauterini zastoj u rastu (prema engl. *Intrauterine growth restriction*); [2]Ventrikularni septalni defekt; [3]Atrijski septalni defekt; [4]Dvostruki izlaz krvnih žila iz desne klijetke (prema engl. *Double outlet right ventricle*)

Tablica 6.15. Prenatalni čimbenici rizika i obilježja ispitanika s Prader Willijevim i Angelmanovim sindromom

	Ispitanik18	**Ispitanik19**	**Ispitanik20**	**Ispitanik21**	**Ispitanik22**	**Ispitanik23**
IUGR[1]	Da	Da	Ne	Ne	Ne	Ne
Asfksija	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
Nedonošenost	Da	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
Strabizam	Da	Da	Da	Da	Ne	Ne
Epilepsija	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Da
Mentalno zaostajanje	Lako	Umjereno	Umjereno	Teško	Lako	Teško
Jezično-govorni razvoj	Usporen	Usporen	Usporen	Usporen	Usporen	Usporen

[1]IUGR − intrauterini zastoj u rastu (prema engl. *Intrauterine growth restriction*)

Tablica 6.16. Prenatalni čimbenici rizika i obilježja ispitanika s Williams-Beurenovim sindromom

	Ispitanik24	**Ispitanik25**
IUGR[1]	Da	Da
Nedonošenost	Da	Ne
Srčana greška	Da[2]	Da[3,4]
Mentalno zaostajanje	Lako	Umjereno
Jezično-govorni razvoj	Usporen	Usporen

[1] IUGR − intrauterini zastoj u rastu (prema engl. *Intrauterine growth restriction*); [2]Stenoza plućne arterije; [3]Ventrikularni septalni defekt; [4]Atrijski septalni defekt

Tablica 6.17. Prenatalni čimbenici rizika i obilježja ispitanika s Cri du Chat sindromom

	Ispitanik26	**Ispitanik27**	**Ispitanik28**	**Ispitanik29**
IUGR[1]	Ne	Da	Ne	Ne
Asfiksija	Ne	Ne	Ne	Ne
Nedonošenost	Da	Ne	Ne	Da
Srčana greška	Ne	Ne	Da[2]	Ne
Epilepsija	Da	Ne	Ne	Ne
Mentalno zaostajanje	Teško	Duboko	Duboko	Umjereno
Jezično-govorni razvoj	Nerazvijen	Nerazvijen	Nerazvijen	Zakašnjeli

[1]IUGR − intrauterini zastoj u rastu (prema engl. *Intrauterine growth restriction*);[2] Ventrikularni septalni defekt

Tablica 6.18. Prenatalni čimbenici rizika i obilježja ispitanika s Wolf-Hirschhornovim sindromom

	Ispitanik30	**Ispitanik31**
IUGR[1]	Ne	Da
Asfiksija	Ne	Ne
Nedonošenost	Da	Ne
Srčana greška	Ne	Ne
Epilepsija	Da	Ne
Anomalije mozga	Ne	Ne
Mentalno zaostajanje	Teško	Duboko
Jezično-govorni razvoj	Nerazvijen	Nerazvijen

[1]IUGR − intrauterini zastoj u rastu (prema engl. *Intrauterine growth restriction*)

6.3. Čimbenici rizika i obilježja ispitanika s fragilnim X sindromom i Rettovim sindromom

Ukupno je utvrđeno 11 ispitanika s fragilnim X sindromom (FRAXA). Kod tri ispitanika utvrđen je Rettov sindrom. U tablici 6.19. prikazani su prikazani su čimbenici rizika, komorbiditeti ispitanika i nalazi logopeda i psihologa.

Tablica 6.19. Broj ispitanika s fragilnim X sindromom i sindromom Rett i nalaz logopeda i psihologa

	Usporen jezično-govorni razvoj	**Zakašnjeli jezično-govorni razvoj**	**Izostanak jezično-govornog razvoja**	**IQ 50 – 69[1]**	**IQ 35 – 49[2]**	**IQ <20[1]**
Fragilni X sindrom	7	4	-	6	5	-
Rettov sindrom	-	-	3	-	-	3

[1]Lako mentalno zaostajanje; [2] Umjereno mentalno zaostajanje; [3]Duboko mentalno zaostajanje

6.4. Čimbenici rizika i obilježja ispitanika ispitanika s aberacijama utvrđenim metodom MLPA subtelomera

Od 50 analiziranih ispitanika kod njih četvero utvrđene su kromosomske aberacije korištenjem MLPA metode, i to kod jedne djevojčice i troje dječaka. U tablici 6.20. prikazani su čimbenici rizika, komorbiditeti ispitanika i nalazi logopeda i psihologa.

Tablica 6.20. Prenatalni čimbenici rizika i obilježja ispitanika s aberacijama u subtelomernim regijama korištenjem MLPA metode

	Ispitanik32	**Ispitanik33**	**Ispitanik34**	**Ispitanik35**
IUGR[1]	Da	Ne	Ne	Ne
Asfiksija	Ne	Ne	Ne	Ne
Nedonošenost	Ne	Ne	Ne	Ne
Epilepsija	Da	Da	Da	Da
Mentalno zaostajanje	Teško	Blago	Umjereno	Lako
Jezično-govorni razvoj	Nerazvijen	Usporen	Usporen	Usporen
Dismorfija	Ne	Da	Da	Da

[1] IUGR − intrauterini zastoj u rastu (prema engl. *Intrauterine growth restriction*)

6.5. Čimbenici rizika i obilježja ispitanika s aberacijama utvrđenim metodom komparativne genomske hibridizacije na mikropostroju

Od 27 analiziranih pacijenata, kod 5 ispitanika utvrđena je patogena promjena. U tablici 6.21. prikazani su čimbenici rizika, komorbiditeti ispitanika i nalazi logopeda i psihologa.

Tablica 6.21. Prenatalni čimbenici rizika i obilježja ispitanika s patogenim promjenama utvrđenim metodom komparativne genomske hibridizacije na mikropostroju

	Ispitanik36	**Ispitanik37**	**Ispitanik38**	**Ispitanik39**	**Ispitanik40**
IUGR[1]	Da	Da	Da	Ne	Ne
Asfiksija	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
Nedonošenost	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
Epilepsija	Ne	Ne	Ne	Da	Da
Anomalije mozga	Da	Ne	Ne	Da	Ne
Srčana greška	Ne	Ne	Da	Ne	Ne
Mentalno zaostajanje	Lako	Lako	Umjereno	Umjereno	Lako
Jezično-govorni razvoj	Usporen	Usporen	Usporen	Usporen	Usporen
Dismorfija	Da	Da	Da	Da	Da

[1] IUGR − intrauterini zastoj u rastu (prema engl. *Intrauterine growth restriction*)

6.6. Čimbenici rizika i obilježja ispitanika bez utvrđenog genetičkog uzroka mentalnog zaostajanja

Kod 168 ispitanika dostupnim citogenetičkim, molekularno-citogenetičkim i molekularnim metodama nisu utvrđeni genetički uzroci mentalnog zaostajanja. U tablicama 6.22. i 6.23. prikazani su čimbenici rizika, komorbiditeti ispitanika i nalazi logopeda i psihologa.

Tablica 6.22. Čimbenici rizika i komorbiditeti ispitanika s mentalnim zaostajanjem bez utvrđenog genetičkog uzroka

	IUGR[1]	Asfiksija	Nedonošenost	Epilepsija	Srčana greška	Dismorfija
Dječaci	8	3	7	2	2	55[2]
Djevojčice	7	8	18	6	1	28
Ukupno	15	11	22	8	3	83

[1] IUGR – intrauterini zastoj u rastu (prema engl. *Intrauterine growth restriction*); [2]Uključeni i ispitanici 41 i 42 s mutacijom u genu *SMC1A*(c.1235G>A; p.Arg412Gin) koja nije povezana sa fenotipom

Tablica 6.23. Nalaz logopeda i psihologa ispitanika s mentalnim zaostajanjem bez utvrđenog genetičkog uzroka

	Usporen jezično-govorni razvoj	Zakašnjeli jezično-govorni razvoj	Izostanak razvoja govora	IQ 50 – 69[1]	IQ 35 – 49[2]	IQ 20 – 34[3]	IQ <20[4]
Dječaci	44	25	10	83	19	12	5
Djevojčice	77	10	2	36	6	5	2
Ukupno	121	35	12	119	25	17	7

[1]Lako mentalno zaostajanje; [2]Umjereno mentalno zaostajanje; [3]Teško mentalno zaostajanje; [4]Duboko mentalno zaostajanje

7. Rasprava

Etiologija MZ-a je varijabilna i uključuje više čimbenika od genetičkih, pa do okolišnih čimbenika posebno socijalnih gdje u sredini koja nije razvojno poticajna može utjecati na kognitivni razvoj pojedinca. Veliki čimbenik rizika su i perinatalni i postnatalni čimbenici rizika posebno infekcije središnjeg živčanog sustava (SŽS), ali i određeni lijekovi korišteni tijekom trudnoće koji osim što uzrokuju MZ, imaju utjecaj i na fenotip, što ukazuje na važnost uzimanja detaljne anamneze. Stoga je cilj istraživanja bio utvrditi ne samo genetičku etiologiju MZ-a, nego prenatalne i perinatalne čimbenike koji su doveli do MZ-a. Uzimanjem detaljne anamneze utvrđeni su socioekonomski čimbenici koji su kod djece s genetičkim uzrokom mogli utjecati na stupanj kognitivnog razvoja, ili su uputili u eventualni autosomno dominatni obrazac nasljeđivanja mentalnog zaostajanja u obitelji. Klinički pregled koji uključuje detaljan opis dismorfije fenotipa, kao i pripadajućih komorbiditeta uputili su na dijagnozu specifičnih mikrodelecijskih sindroma. Definirano je podrijetlo aberacije, kao i utjecaj na fenotip koji je bio varijabilan između pojedinaca sa istim genetičkim uzrokom. To ukazuje na važnost točnog definiranja veličine promjene na utvrđivanje gena koji nedostaju ili su višak, što nam omogućuje bolje razumijevanje varijabilnosti fenotipa. Točno definiranje korelacije fenotip-genotip bitno je za utvrđivanje komorbiditeta, kao i njihovo praćenje, ali i pravovremeno liječenje, jer se neki komorbiditeti mogu javiti u kasnijoj životnoj dobi. Utvrđivanjem podrijetla aberacije omogućeno je genetičko savjetovanje i prenatalna dijagnostika. Istraživanje je pokazalo da ispitanici koji imaju genetičku podlogu MZ-a često imaju i prenatalne čimbenike rizika kao što su IUGR i nedonošenost. Utvrđeno je da svi ispitanici imaju usporen jezično-govorni razvoj, a kod nekih je usporen i rani motorički razvoj. Uporabom citogenetičkih, molekularno-citogenetičkih metoda i metoda molekularne genetike utvrdili smo genetičku etiologiju MZ-a kod dijela ispitanika uključenih u istraživanje. Opisani su potencijalni geni kandidati u podlozi MZ-a.

Nedostatak istraživanja je dugotrajnost, te praćenje ispitanika koje je neophodno radi pravilne fenotipizacije koja se kod pojedinih bolesnika s godinama mijenja te radi postupnosti genetičke obrade koja je kod djece s MZ-om zahtijevala višestruke reevaluacije višedisciplinarne obrade kao i slikovnih i genetičkih analiza. Kod definiranja novih fenotipova važno je provesti kompleksnu obradu, a potom ju pratiti kroz vrijeme kako bi se moglo adekvatno prikazati fenotip i pripadajuće komorbiditete koji se razvijaju tijekom rasta i razvoja.

S obzirom na ograničenu dostupnost genetičkih metoda, kod djela ispitanika uzrok MZ-a će za sada ostati neutvrđen, a većinom je riječ o ispitanicima s izoliranim MZ-om. Dio pacijenata početno uključenih u praćenje prestao je dolaziti na kontrolu, manji dio roditelja/skrbnika nisu dali suglasnost za daljnje istraživanje te su morali biti isključeni iz studije i praćenja.

Odavno je prepoznato da je više muške djece s MZ-om u odnosu na žensku djecu (25 − 30 %) što se može objasniti većim udjelom X-vezanog mentalnog zaostajanja zbog većeg broja mutiranih gena na X kromosomu (155). Prema literaturi, MZ se i do četiri puta češće javlja kod dječaka nego kod djevojčica. Neke studije sugeriraju da je blago MZ možda zastupljenije među ženama; međutim, ove studije provedene su u specifičnim zajednicama i ne moraju se nužno primjenjivati na opću populaciju. Omjer dječaka i djevojčica u našem istraživanju iznosi 1,75:1, odnosno ispitano je gotovo dvostruko više dječaka nego djevojčica. Ta varijacija u omjeru može biti posljedica selekcije ispitanika, no i dalje je u skladu s literaturnim podatcima, a posljedica je inače većeg udjela dječaka u populaciji pacijenata s MZ-om.

Najčešći pojedinačni nalazi u podlozi MZ-a prema literaturnim podatcima su kromosomske aberacije koje se nalaze u 4 – 34 % ispitanika s MZ-om. Numeričke kromosomske aberacije čine oko polovice svih uzroka MZ-a. To se prvenstveno odnosi na aberacije utvrđene GTG-pruganjem, a to su trisomija 21, potom slijede trisomija 18 i 13. Učestalost numeričkih aberacija se kreće oko 8,8 % (156). Broj detektiranih numeričkih kromosomskih aberacija kod ispitanika s dijagnozom MZ-a uvelike ovisi o uključivanju ili isključivanju ispitanika s kliničkom dijagnozom DS-a. Kako je provedeno istraživanje uključivalo ispitanike s kliničkom slikom DS-a ukupni postotak detektiranih kromosomskih aberacija GTG-pruganjem (81,1 %) je nešto veći u odnosu na dosadašnja istraživanja (157).

Postotak detektiranih mikrodelecijskih sindroma je niži u odnosu na literaturu što ovisi o selekciji ispitanika. Mali broj pacijenata s DGS u našem istraživanju mogao bi se objasniti varijabilnošću fenotipa koji je u nekim slučajevima vrlo blag ili se može zamijeniti s drugim sindromima. Karakterističan fenotip ispitanika s PWS, WHS i CdCS bio je prisutan kod svih ispitanika u dojenačkoj dobi kada je i postavljena dijagnoza. Svi ispitanici s CdCS imaju teško MZ, osim jednog ispitanika koji ima umjereno MZ. Blaži fenotip se može povezati sa manjom delecijom 5p, a u literaturi se spominju slični slučajevi gdje je veličina delecije 5,5Mb (158).

Povezanost fenotipa i genotipa kod nebalansiranih i balansiranih strukturnih aberacija utvrđenih GTG-pruganjem su opisane u nastavku.

Nebalansirana translokacija 2;4, nastala kao posljedica očeve balansirane translokacije t(2;4)(p25.1;q31.3) s posljedičnom parcijalnom trisomijom 4q31.3→qter i parcijalnom monosomijom 2p25.1→pter kod ispitanika 1 ima fenotipskih značajki opisanih kod pacijenata sa sindromom duplikacije 4q i monosomijom 2p. Cernakova i suradnici (159) su opisali dup(4)(q28-qter) kod pacijenta sa teškim MZ-om, mikrocefalijom i dismorfijom, dok su Cui i suradnici (160) prikazali dup(4)(q27-qter) kod pacijenta s niskim rastom, blažim MZ-om i dismorfijom. Duplikacija u regiji 4q uzrokuje različite kliničke slike, a fenotip pacijenata sa zahvaćenom regijom 4q31-q33 karakterizira usporeni psihomotorički razvoj, duboko postavljene oči, strabizam, hipertelorizam, epikantalni nabori, nisko postavljene i loše oblikovane uške, kratak vrat, klinodaktilija i blago MZ (161). Francis i suradnici (162) su opisali del(2)(pter-p24) kod pacijenta sa niskim rastom, mikrocefalijom i dismorfijom. Lo-Castro i suradnici (163) su opisali del(2)(pter-p25.2) kod pacijenata sa mikrocefalijom, dismorfijom, MZ-om, bez odstupanja u rastu. Osim mikrocefalije i niskog rasta, ispitanik 1 ima većinu obilježja sindroma duplikacije 4q. Regija 2p25.1 sadrži *SOX11* gen (OMIM*600898). SOX proteini reguliraju ekspresiju gena, djelujući bilo kao transkripcijski pojačivač ili utišavač i imaju ulogu u više razvojnih procesa (164, 165), pa tako i u neurokognitivnom razvoju. Monosomija 2p može imati učinak na MZ kod ispitanika (166, 167).

Duplikacija 10pter->10p11.2 nastala je kao posljedica nebalansirane translokacije t(10;11;1)(10pter→10p11.2::11q25→11q23::1p34.3→1qter). Promjena je naslijeđena od majke nositeljice balansirane translokacije. Duplikacija 10pter opisana je u sklopu trisomije 10, a u većina slučajeva je rezultat obiteljske balansirane translokacije. Najčešća točka loma nalazi se na poziciji p11, ali može biti distalnije i rezultirati djelomičnom trisomijom. U regiji se nalaze geni *WAC* (OMIM*615049), *DFNB33* (OMIM607239*), *MTPAP* (OMIM*613669). Gen *WAC* izražen je u mozgu, a mutacije u genu su povezane s MZ-om. Klinička slika pacijenata uključuje MZ, niski rast, hipotoniju u dojenačkom razdoblju i dismorfiju lica (visoko i izbočeno čelo, naglašene obraze, epikantalne nabore, širok nosni korijen, nisko položene uške, visok svod nepca, mikrognatiju). Megarbane i suradnici (168) opisali su duplikaciju 10p11.2→p12.2 kod pacijenta s MZ-om, strabizmom i mikrognatijom. Fryns i suradnici (169) su opisali pacijenta sa parcijalnom duplikacijom kratkog kraka kromosoma 10 dup(10p)(pter→p12::p12::p12→qter) i fenotipom koji je uključivao dismorfiju i teško MZ. Kulharya i suradnici (170) su opisali pacijenta s MZ-om, dismorfijom fenotipa i anomalijama mokraćnog sustava. Fenotip ispitanika 2 koji uključuje umjereno MZ, visoko čelo, egzoftalmus, epikantalne nabore, sedlast nosni korijen, visok svod nepca, mikrognatiju, široka

usta, nepravilan rast zuba, nizak rast kose na vratu, nisko položene uške, dvostruki mokraćovod, ima kliničke značajke djelomične trisomije kromosoma 10 (171).

Derivirani kromosomom 22 koji se sastoji od regije kromosoma 22 (22pter→22q11.2) i X kromosoma (Xq28→Xqter) naslijeđenim od majke, rezultirao je trisomijom 22q11.2 i monosomijom Xq28 kod ispitanika 3. Gen *MECP2* (OMIM*300005) koji se nalazi u regiji Xq28 kodira protein Mecp2 koji sudjeluje u aktivaciji i deaktivaciji transkripcije gena. Najviše je zastupljen u živčanim stanicama, posebno mozgu gdje sudjeluje u sazrijevanju neurona i održavanju sinapsi (172, 173). Iako su mutacije u samom genu uzrok teškog psihomotoričkog zaostajanja i povezane su s klasičnim Rett sindromom, opisane su i delecije gena *MECP2* kao rijedak uzrok teškog psihomotoričkog zaostajanja i epilepsije (174, 175, 176, 177). Hipotonija, MZ, apnoične atake, encefalopatija u ranoj dojenačkoj dobi kod ispitanika 3 zajedničke su s pacijentima sa intersticijskom duplikacijom u regiji 22q11.2 veličine 3Mb koju su opisali Edelmann i suradnici (178). Regija 22q11.2 sadrži gene *TXNRD2* (OMIM*606448), *COMT* (OMIM*116790) i *ARVCF* (OMIM*602269) koji imaju ima utjecaj na kognitivni razvoj. Delecija regije Xq28 koja zahvaća *MECP2* gen može se povezati sa simptomatskom epilepsijom i teškim psihomotoričkim zaostajanjem kod ispitanika 3.

Intersticijska delecija segmenta 2q31-2q33 povezana je s MZ-om, dismorfijom lica, anomalijama srca, oka i udova (179). Regija 31q33 na kromosomu 2 sadrži gen *ZNF385B* (OMIM*612344) koji je izražen u mozgu, a ima ulogu transkripciji RNA. Anomalije udova posljedica su delecije HOXD klastera (180, 181). Klaster HOXD (*HOXD13, HOXD11, HXOD10, HOXD9, HXOD8, HOXD4, HOXD3, HOXD1* (OMIM**142987) jedan je od četiri homologna genska klastera koji kodiraju transkripcijske čimbenike koji imaju ulogu u embrionalnom razvoju i formiranju udova. Opisani fenotip pacijenata u literaturi prisutan je i kod ispitanika 4, a uključuje teško psihomotoričko zaostajanje, anomalije udova, srčanu grešku, mikrocefaliju, ptozu kapaka, uzak očni rasporak, rascjepljenu uvulu, mali nos, loše oblikovane i male uške, dugačak filtrum, tanku gornju usna, mikrognatiju, zastoj u rastu i razvoju i anomalije oka – kolobom šarenice.

Prstenasti kromosom nastao kao posljedica delecije regije 22q13 i subtelomerne regije 22pter doveo je do gubitka *SHANK3* gena (OMIM*606230) u regiji 22q13. *SHANK3* gen kodira protein Prosap2 koji se nalazi u postsinapsama i ekscitatornim sinapsama i najviše je zastupljen u malom mozgu. Haploinsuficijencija gena kod svih ispitanika odgovara kliničkoj slici koja uključuje zaostanje u psihomotoričkom razvoju, usporen jezično-govorni razvoj i MZ (182, 183). Među 10 dosad opisanih slučajeva s kriptičkom delecijom 22qter svi pokazuju

usporen jezično-govorni razvoj. Ostale kliničke značajke, dismorfija, anomalije ekstremiteta, autistični poremećaji i poremećaji ponašanja su opisane kod pacijenata sa prstenastim kromosomom 22 (184). Kod pacijenta sa delecijom 22qter opisano je lako MZ i normalan rast i opseg glave, što je slično fenotipu ispitanika 5. Različiti fenotipovi prstenastog kromosoma 22 i delecije 22qter mogu biti posljedica susjedne disfunkcije gena (185).

Novonastala nebalansirana translokacija t(4:8)(4pter→4p16.1::8p23.1→8qter) rezultirala je djelomičnom trisomijom 4p i monosomijom 8p kod ispitanika 6. Ispitanik 6 ima mikrocefaliju, dismorfiju lica, MZ i srčanu grešku. Srčana greška prisutna kod ispitanika 6 može se povezati s delecijom u genu *GATA4* (OMIM*600576) koji se nalazi u regiji 8p. Sličan fenotip je opisan kod delecije 8p23 i delecije 8p21 (186). Gen *TNKS* (OMIM*603303) ima ulogu u regulaciji duljine telomera putem ADP ribozilaze. Povezuje se s MZ-om kod pacijenata sa sindromom delecije 8p23.1. Granično MZ je opisano kod ispitanika gdje gen *TNKS* nije bio zahvaćen, što upućuje na povezanost između težine MZ-a s delecijom gena. Khelifa i suradnici (187) opisali su pacijenta sa sindromom delecije 8p i mikrocefalijom, dismorfijom lica i MZ-om, no bez srčane greške. Mikrocefalija je vjerojatno rezultat delecije gena *MCPH1* (OMIM*607117), što je opisano u više slučajeva sa delecijom 8pter. Također, zabilježene su mutacije ovog gena povezane s primarnom autosomno recesivnom mikrocefalijom 1. Većina ispitanika sa zahvaćenom regijom 4p16.3 ima MZ i zaostatak u rastu, što može bit povezano s duplikacijom gena *FGFR3* na poziciji 4p16.3. To bi moglo biti objašnjenje za nedostatak zaostajanja u rastu kod ispitanika 6. Izuzev mikrocefalije ispitanik 6 ima većinu kliničkih značajki povezanih sa duplikacijom 4p (nizak rast kose na vratu, hirzutizam, širok nosni korijen, nisko postavljene uške, teško psihomotoričko zaostajanje) (188).

Kod ispitanika 7 utvrđen je prekobrojni marker kromosom 5p. Većina slučajeva trisomije kratkog kraka kromosoma 5 povezana je s nasljednom obiteljskom translokacijom, dok je opisano samo pet slučajeva marker kromosoma 5p. Ključna regija za sindrom trisomije 5p nalazi se distalno na kratkom kraku 5p13 te su simptomi slični kao u slučaju čiste trisomije 5pter→5p13. Klinička slika najčešće obuhvaća MZ, dismorfiju fenotipa i hipotoniju (189). Kod svih pacijenata opisanih u literaturi zahvaćen je *NIPBL* gen (OMIM*608677) koji kodira protein delangina, koji igra ulogu u razvoju. Patogene mutacije unutar gena *NIPBL* uzrokuju haploinsuficijenciju i povezane su sa sindromom Cornelia de Lange. Duplikacije regije na kromosomu 5 koje sadrže ovaj gen zabilježen je kod pacijenata sa kašnjenjem u kognitivnom razvoju, ali i morfogenezi. Dilatacijska kardiomiopatija opisana je kod slučajeva sa mutacijom *NIPBL* gena, dok su pacijenti s duplikacijom 5p13 imali aortalnu dilataciju i epilepsiju (190).

Dilatacijska kardiomiopatija opisana kod ispitanika 7 nije do sada povezana sa prekobrojnim markerom kromosoma 5.

Klinička slika ispitanika 8 sa segmentalnom monosomijom 3p25 preklapa se s intersticijskom delecijom 3p25 delecije koje su opisali Gunnarsson i Foyn Bruun (191), Riess i suradnici (192) i Peltekova i suradnici (193). Ispitanik 8 ima fenotipske sličnosti, uključujući MZ, hipotoniju, dismorfiju, s opisanim slučajevima, dok nije imao srčanu grešku, epilepsiju i mikrocefaliju koju su opisali Peltekova i suradnici (193) gdje je delecija zahvaćala regiju distalno od centromere. Varijabilnost u težini MZ-a opisanog u pojedinim slučajevima sindroma delecije 3p upućuje na to da više gena u regiji 3p sudjeluje u nastanku kognitivnog zaostajanja. Gen *SETD5* (OMIM*615743) nalazi se u regiji 3p25, najviše je izražen u mozgu. Haploinsuficijencija gena *SETD5* opisana je kod pacijenata sa blagim do teškim MZ-om. Pacijenti s mutacijama *SETD5* pokazali su fenotipsku sličnost sa sindromom 3p25, pa bi se delecija gena *SETD5* mogala povezati s kliničkim značajkama navedenog sindroma, posebno s MZ-om (194).

Nebalansirana translokacija t(4;13)(q33;q14.1) kod ispitanika 9 naslijeđena je od majke. Translokacija je rezultirala parcijalnom trisomijom 13q14.1qter i parcijalnom monosomijom 4q33qter. Parcijalne duplikacije koje zahvaćaju proksimalni segment (13q11→ q14) pokazuju neke značajke trisomije 13 (Patau sindroma) koje uključuju sedlast korijen nosa, gomoljast nosni vršak, rascjep tvrdog i mekog nepca, klinodaktiliju. Pacijenti s distalnim duplikacijama (13q14→qter) imaju većinu obilježja sindroma parcijalne trisomije 13 koje uključuju teško psihomotoričko zaostajanje, mikrocefaliju, mikroftalmiju, preaurikularne kožne privjeske, rascjep nepca, epilepsiju, srčanu grešku, polidaktiliju (195, 196). Ispitanik 9 ima mikrocefaliju, mikrooftalmiju, rascjep nepca, srčanu grešku i klinodaktiliju, dok polidaktilija i preaurikularni privjesci nisu opisani. Dutrillaux i suradnici (197) su opisali mikroftalmiju i teško psihomotoričko zaostajanje kod pacijenta s del4 (q33→qter) nastalom kao posljedica t(4;21), dok su pacijenti sa del4(q33→qter) imali sedlast korijen nosa, mikrognatiju, malpoziciju prstiju i zaostatak u rastu što nije opisano kod ispitanika 9 (198).

Balansirane translokacije se smatraju jednim od mogućih uzroka MZ-a. Nema točnih podataka o učestalosti balansiranih translokacija kod MZ-a, ali u jednoj studiji utvrđeno je da je u 1,5 % pacijenata s MZ-om balansirana translokacija povezana sa MZ-om (199). U studiji koju su proveli Fryns i suradnici (200) utvrđen je sličan udio balansiranih translokacija među pacijentima s MZ-om. Translokacija može dovesti do disrupcije u genu, a utvrđivanje tipa poremećaja u slijedu može ukazivati na potencijalni gen MZ-a. Balansirane translokacije

t(9;22)(q34.3;q12); t(7;9)(q21.2;q13) uvrđene kod ispitanika 11, 12 i 13 do sada nisu opisane u literaturi kao uzrok MZ-a. Kod ispitanika 11 i 12 u regiji 9q3.1 nalazi se gen *GFI1B* (OMIM* 604383) koji kodira transkripcijski faktor za hematopoezu i megakariopoezu, a povezan je sa poremećajima zgrušavanja. Nije povezan s fenotipom ispitanika. Regija 22q11.2 sadrži gene odgovorne za fenotip DGS (*TBX1, COMPT* i *PRODH*), a gen *TBX1* odgovoran za veći dio fenotipa DGS, prema kliničkoj slici nije povezan sa fenotipom ispitanika. Kod ispitanika 13 translokacijom su zahvaćene regije 7q21.2 i 9q13. U regiji 7q21.2 nalazi se gen *CDK6* (OMIM*603368) koji je eksprimiran u kori velikog mozga i gen je kanidat za AR mikrocefaliju (OMIM#616080). Mutacija u genu *CDK6* opisana je u konsangvinoj obitelji s mikrocefalijom i umjerenim MZ-om (201). Prema Decipher bazi podataka (https://decipher.sanger.ac.uk/) nisu utvrđeni poznati geni u regiji 9q13 povezani sa fenotipom. U regiji 10q21.1 koja je zahvaćena kod ispitanika 10 sa t(6;10)(q16.1;q21.1) nalazi se gen *PCDH15* (OMIM*605514). Mutacije u genu *PCDH15* povezane su sa Usherovim sindromom (OMIM#602083), a zabilježeno je u više slučajeva pojava neuropsihijatrijskih problema kod pacijenata sa navedenim sindromom (202). Mutacije u genu *PCDH15* opisane su u kod pacijenta sa mikrocefalijom, gluhoćom i MZ-om (203). Gen *PCDH15* koji kodira člana super porodice kadherina koji doprinosi neuralnom razvoju i funkciji, mogao bi biti gen kandidat za MZ kod ispitanika 10. Prema bazi podataka Decipher kod pacijenta s mikrocefalijom, MZ-om, srčanom greškom i dismorfijom utvrđen je heterozigni status gena *PCDH1*.

Povezanost fenotipa i genotipa kod ispitanika s utvrđenim kromosomskim aberacijama metodom aCGH opisana je u nastavku.

Kod ispitanika 36 i 37 utvrđene su tri kopije genomske regije 17p13.1(7512573_8019071) veličine 506,5 kb. Regija 17p13.1 sadrži 23 gena, od čega su patogeni *TP53, WRAP53, KDM6B, CHD3, GUCY2D, ALOX12B, ALOXE3*. Geni *ALOX12B i ALOXE3*, povezani su s urođenom ihtiozom (OMIM#242100; OMIM#606545); gen *GUCY2D* povezan je s distrofijom mrežnice 6 (OMIM#601777) i Leberovom urođenom amaurozom 1 (OMIM#204000). Gen *TP53* (OMIM*191170) kodira protein p53, ključnu komponentu u kontroli kontrolne točke staničnog ciklusa i održavanju integriteta genoma, povezan je s nastankom karcinoma. *WRAP53* gen (OMIM*612661) povezan je s kongenitalnom diskeratozom (OMIM#613988). Nijedan od ovih patoloških gena nije povezan sa fenotipom ispitanika. Gen *KDM6B* (OMIM*611577) kodira histon H3K27 demetilazu koja sudjeluje u demetilaciji histona H3 koji regulira ekspresiju gena tijekom neurološkog razvoja. Heterozigotne mutacije u genu *KDM6B* opisane su kod pacijenta sa neurorazvojnim

poremećajima, dismorfijom lica i anomalijama koštang sustava (prema engl. *Neurodevelopmental disorder with coarse facies and mild distal skeletal abnormalities*, NEDCFSA; OMIM#618505). *KDM6B* gen bi se mogao biti kandidatni gen MZ-a kod ispitanika 35 i 36. U literaturi je do sada opisano sedam slučajeva s mikroduplikacijom 17p13.1, a veličine duplikacije su bile između 62,50 i 788 kb (204, 205, 206, 207, 208, 209). Fenotip pacijenata je varijabilan, ali je svima zajedničko mentalno zaostajanje, dismorfija fenotipa i nizak rast. Coutton i suradnici (206) opisali su duplikaciju u regiji 17p13.1 veličine 568 kb kod pacijenta s makrocefalijom, dismorfijom koja je uključivala naglašeno i visoko čelo, trokutasti oblik lica i mikrognatiju, te smanjen rast. Smanjen rast povezan sa deficitom IGF-1 opisali su i Leka-Emiri i suradnici (204). Geni *GABARAP i SLC2A4* su povezani sa smanjenim rastom, dok je gen *GABARAP* povezan i s MZ-om. Kod ispitanika nisu utvrđeni geni povezani sa smanjenim rastom, s obzirom da u zahvaćenoj regiji (7512573_8019071) nisu prisutni poznati geni povezani sa smanjenim rastom. S obzirom da je duplikacija 17p13.1 prisutna i kod majke ispitanika s istim fenotipom moguće da je ovdje riječ o obiteljskom smanjenom rastu koji se smatra normalnom varijantom u populaciji. Makrocefaliju su opisali Mooneyham i suradnici (209) kod dva pacijenta, te Coutton i suradnici (206). Mikrocefalija prisutna kod ispitanika nije do sada opisana kod duplikacije u regiji 17p13.1. U literaturi je mikrocefalija opisana kod duplikacije u regiji 17p13.1 i povezuje se s delecijom gena *ASGR1, ACADVL, DVL2* i *GABARAP*, no višak gena se ne povezuje s mikrocefalijom (210). Belligini i suradnici (205) su opisali duplikaciju 17p13.1 (6013291_9214914) veličine 790 – 830 kb kod pacijenta sa MZ-om, niskim rastom, epilepsijom, pretilošću i endokrinološkim poremećajima koji su uključivali hipotireoidizam i dijabetes. Geni *NLGN2* (OMIM*606479) i *EFNB3*(OMIM*602297) kandidati su za MZ. *GLUT4* gen (OMIM*138190) ima ulogu u dijabetesu tipa 2. Kuroda i suradnici (208) su opisali duplikaciju 17p13.1 (6013291_9214914) veličine 3,2 Mb kod pacijenta s MZ-om, dismorfijom koja je uključivala okruglo lice, širok nosni vršak, anteverziju nosnica, a od endokrinoloških poremećaja pacijent je imao dislipidemiju. Kod ispitanika nisu opisani endokrinološki poremećaji niti epilepsija, a dismorfija lica kod ispitanika koja uključuje trokutast oblik lica, sinofris, anteverziju nosnica, mikrognatiju, nizak rast kose na čelu nije prisutna u opisanim slučajevima. S obzirom na velike razlike u fenotipu ispitanika u usporedbi s ostalim opisanim slučajevima moguće je da je duplikacija 506,5 kb funkcionalno neutralni polimorfizam broja kopija, a fenotip obitelji može biti rezultat drugih genetskih abnormalnosti.

Kod ispitanika 38 utvrđena je delecija veličine 172,6 kb u regiji 7q11.22 (70017352_70189959) koja zahvaća gen *AUTS2* (OMIM*607270). Gen *AUTS2* aktivira ekspresiju gena u mozgu vežući se za polycomb represivni kompleks 2 (PRC2) koji sadrži histon metiltransferazu koja potiskuje transkripciju gena remodeliranjem kromatina. Disrupcije u genu su povezane s MZ-om i smatra se genom kandidatom za MZ (211). Fenotip pacijenata sa disrupcijom gena *AUTS2* uključuje mikrocefaliju, nizak rast, hipertelorizam, ptozu, proptozu, epikantalne nabore, mikrognatiju, prirođenu srčanu grešku, artrogripozu, hipotoniju i epilepsiju. Većina pacijenata s delecijom ima poteškoće s hranjenjem i slabije napredovanje na tjelesnoj težini. Kalscheuer i suradnici (212) su opisali pacijenta s teškim MZ-om, hipoplazijom korpus kalozuma, obostranom hipoplazijom vidnog živca, gluhoćom i kifoskoliozom, te dismorfijom koja je uključivala makroglosiju, mikrognatiju, nisko položene i loše oblikovane uške. Fenotip ispitanika 38 koji uključuje MZ, IUGR, hipotoniju, srčanu grešku, skoliozu, ekvinovarus stopala, mikrocefaliju, rascjep tvrdog nepca, provodnu nagluhost, dijeli većinu fenotipskih oznaka povezanu s disrupcijom u genu *AUTS2*, osim rascjepa nepca i epilepsije. Smatra se da pacijenti s malim delecijama egzona 2 – 5 gena *AUTS2* imaju blažu kliničku sliku, dok delecije koje uzrokuju haplinsuficijenciju gena su povezane sa težim MZ-om kod pacijenata. Hipersocijalno ponašanje je opisano kod nekih pacijenata sa AUTS2 sindromom (OMIM#615834). U regiji 7q11.22 nalazi se i gen *WBSCR17* (OMIM*615137) koji se nalazi u blizini *AUTS2* gena. Gen *WBSCR17* je dio obitelji *GALNT* gena koji uključuju *GALNT8*, *GALNT9* i *GALNT18*, a izraženi su u mozgu i smatraju se odgovornima za specifično hipersocijalno ponašanje pacijenata sa WBS-om (213).

Kod ispitanika 39 utvrđene su četiri kopije regije 16p13.11p11.2 veličine 11.8 ± 0,1 Mb. Tetrasomija kromosoma 16 nije do sada opisana ni u jednom slučaju. Fenotip ispitanika usporedili smo s fenotipom ispitanika s parcijalnom duplikacijom 16p i trisomijom 16p opisanim u literaturi. Parcijalna 16p duplikacija opisana kod 27 pacijenata najčešće je zahvaćala citogenetički regiju 16p13.13, a fenotip je uključivao mikrocefaliju, dismorfiju fenotipa (ptozu, uske očne rasporke, rascjep nepca, mikrognatiju) i prirođenu srčanu grešku (214). Ispitanik 39 ima MZ, mikrocefaliju, uže očne rasporke, gomiljast vršak nosa, dugačak filtrum, visok svod nepca, niže položene uške, hipolaziju korpusa kalozuma, epilepsiju i ADHD. Nema mikrognatiju i srčanu grešku. Pacijenti sa trisomijom 16p13.11 imaju epilepsiju, razvojen anomalije mozga, ADHD, psihomotoričko zaostajanje, a kod nekih se opisuje i dismorfija fenotipa koja uključuje sedlast korijen nosa, retrognatiju, epikantalne nabore, sindaktiliju te malformacije srca i bubrega (215). Geni prisutni u regiji 16p13.11 su *C16orf45*,

KIAA0430, NDE1, MYH11, FOPNL, ABCC1, ABCC6, NTAN. Dva od ovih gena, *NDE1* (OMIM*609449) i *NTAN1* (OMIM*615367), uključeni su u neurokognitivni razvoj. Iako je gubitak broja kopija u tim genima rezultirao neurološkim manifestacijama na životinjskim modelima, uloga dupliciranja ovih gena u poremećajima ponašanja i kognitivnih sposobnosti nije dobro utvrđena. Regija 16p11.2p12.2 zbog svoje velike količine STR lokusa smatra se kandidatnom regijom za autistične poremećaje. Finelli i suradnici (216) su opisali pacijente kojima je zajedničko obilježje lako do umjereno teško MZ i autistični spektar poremećaja. Geni *SLC5A11* (OMIM*610238) i *CACNG3* (OMIM*606403) povezuju se s autizmom, a mogu se povezati s ADHD-om kod ispitanika.

Kod ispitanika 40 utvrđene su tri kopije veličine 1,39 Mb regije 17q12 (34856055_36248918). Fenotip ispitanika pokazuje slične kliničke značajke s 17q12 duplikacijskim sindromom (OMIM#614526). Mefford i suradnici (217) su opisali dva pacijenta s blagim do umjerenim MZ-om, epilepsijom i fokalnom kortikalnom displazijom. Geni *LHX1* (OMIM*601999) i *TCF2* (OMIM* 189907) nalaze se u regiji 17q12 i smatraju se odgovornima za kognitivno funkcioniranje. Mencarelli i suradnici (218) su opisali pacijenta sa teškim MZ-om i višestrukim malformacijama koje uključuju mikroftalmiju, rascjep mekog nepca, srčanu grešku i brahidaktiliju. Zahvaćena regija veličine 1,8 Mb obuhvatila je *TCF2* gen. Nagamani i suradnici (219) su opisali pet pacijenata s MZ-om. Duplikacije kod svih pacijenata obuhvaćale su najmanje 1,06 Mb, a zahvaćale su gene *LHX1, CCL3L3* (OMIM*609468) i *SNIP* (OMIM*610786). Caselli i suradnici (220) opisali su pacijenta s MZ-om i duplikacijom veličine 12,4 Mb kromosoma 17q11.2-q12, koji obuhvaća gen *NF1* (OMIM*613113). Pacijent je imao megakalikozu lijevog bubrega, hipoplastičan korpus kalozum, dolihocefaliju, trokutasto lice, mikrognatiju i hipotoniju. Fenotip ispitanika uključuje lako MZ, epilepsiju i dismorfiju, bez malformacija drugih organa, što se može objasniti manjom zahvaćenosti regije 17q12, gdje su zahvaćeni geni *LHX1* (OMIM*601999) i *SNIP* (OMIM*610786) koji su visoko izraženi u mozgu.

Hemizigotna mutacija u genu *SMC1A* (c.1235G>A; p.Arg412Gln) prema bazi podataka ClinVar smatra se varijantom nepoznatog značenja (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/976786/, pristupljeno 1. listopada 2020). S*MC1A* gen (OMIM*300040) kodira protein SMC1A koji je dio multiproteinskog kompleksa koji je uključen u koheziju kromatida tijekom replikacije DNA i regulacije transkripcije. Hemizigotne mutacije u genu *SMC1A* (c.2368C>T;p.Arg790Trp) opisane su kod pacijenata sa Cornelia de Lange sindromom (OMIM#300590) i razvojnim zaostajanjem i encefalopatijom

(prema engl. *Developmental and epileptic encephalopathy 85, with or without midline brain defects*, DEE85; OMIM#301044). Fenotip ispitanika 41 i 42 uključuje mikrocefaliju, lako MZ i blažu dismorfiju fenotipa bez fenotipskih značajki sindroma. Varijanta je prisutna kod majke koja također ima mikrocefaliju, ali je urednog kognitivnog razvoja, stoga fenotip ispitanika vjerojatno nije povezan s hemizigotnom mutacijom u genu *SMC1A.*

U istraživanju je najveći udio kromosomskih aberacija utvrđen citogenetičkim metodama (87/300), a većinom je bilo riječ o ispitanicima koji su uz MZ imali dismorfiju fenotipa, ali i malformacije organskih sustava. Najveći udio su činile numeričke kromosomske aberacije kao što je DS (62/87), u 17 ispitanika utvrđene su strukturne aberacije. Prema literaturi postoje velike razlike u učestalosti kromosomskih aberacija utvrđenih citogenetičkim metoda kod pacijenata s MZ-om. Ispitivanje provedeno na 419 djece s MZ-om na jugu Tajvana utvrdila je kromosomske abnormalnosti u 22,43 % slučajeva, a trisomija 21 (DS) je utvrđena u 77 slučajeva (18,38 %). Aneuploidije spolnih kromosoma pronađene su u tri slučaja (0,72 %), a strukturne abnormalnosti autosoma pronađene su u 13 slučajeva (3,10 %) (221). U istraživanju provedenom na 200 djece s MZ-om u Argentini otkrili su kromosomske abnormalnosti u 42 slučaja (21 %), u 26 slučajeva strukturne aberacije (222). Dvije studije provedene su u Nizozemskoj. Jedno istraživanje provedeno u Amsterdamu utvrdilo je u 22,1 % ispitanika aberacije citogenetičkim metodama. Od toga je 14,3 % bilo bolesnika s DS-om, a 6,1 % je imalo druge kromosomske abnormalnosti (223). Drugo istraživanje provedeno u Amsterdamu pokazalo je da je 7,5 % pacijenata imalo strukturne kromosomske aberacije (224). Istraživanje provedeno u Poljskoj pokazalo je da je učestalost abnormalnih kariotipa kod pacijenata s MZ-om bila 10,1 %. Međutim, postotak utvrđenih kromosomskih aberacija u bolesnika s izoliranim MZ-om iznosio je 2,2 % (225). Iako je ukupna učestalost kromosomskih abnormalnosti u ovim istraživanjima bila slična, u drugim istraživanjima zabilježeni su niski postotci kromosomskih aberacija. Celep i suradnici (2006) utvrdili su samo 4,81 % uzroka MZ-a citogenetičkim metodama u istraživanju provedenom na 457 pacijenata s MZ-om. Van Karnebeek i suradnici (2002) su pokazali je da je prosjek utvrđenih kromosomskih aberacija klasičnom citogenetikom oko 9,5 %, i to 4,1 % kod ispitanika s lakim i umjerenim MZ-om, pa do čak 13,3 % s teškim MZ-om udruženih s malformacijama. Rezultati navednih istraživanja ukazuju na potrebu uporabe klasičnih-citogenetičkih i molekularno-citogenetičkih metoda kod dijagnoze pacijenata s MZ-om.

U skupini ispitanika kojima je napravljena MLPA analiza subtelomera svi ispitanici su imali uredan kariotip, a kod muških ispitanika je isključen fragilni X sindrom. Aberantni

rezultati su nađeni kod 8 % (4/50) ispitanika. Mala detekcija kormosomskih aberacija MLPA analizom kod ispitanika s MZ-om u provedenoj studiji može biti posljedica isključivanja iz postupka MLPA analize ispitanika s vidljivim strukturnim i numeričkim kromosomskim aberacijama utvrđenim GTG-pruganjem, kao i ispitanika s fragilnim X sindromom, te ispitanika sa fenotipski poznatim mikrodelecijskim sindromima potvrđenim FISH analizom. Prema studiji koja je obuhvaćala 11688 ispitanika s MZ-om submikroskopske aberacije subtelomernih kromosomskih regija nalaze se u 2,5 % ispitanika (226). Studija u Poljskoj provedena na 256 ispitanika s idiopatskim MZ-om utvrdila je pozitivan nalaz u 15 (4,8 %) pacijenata (227). U studiji provedenoj na 180 pacijenata s MZ-om u 7 % su utvrđene subtelomerne aberacije i to većinom delecije (228). Wu i suradnici (2010) su u istraživanju na 451 kineske djece s idiopatskim MZ-om utvrdili u 5,1 % ispitanika abnormalnosti u subelomernoj regiji (229), dok su Palomares i suradnici (230) utvrdili dvostruko veći postotak subtelomernih aberacija. S obzirom na to da je MLPA metoda u ovome istraživanju testirana kao metoda probira, dobivene smo rezultate dodatno testirali metodom aCGH kojom je samo kod jednog ispitanika povrđena promjena (dup21q22.3) koja se smatra vjerojatno benignom. Ovakve razlike u nalazima možemo objasniti činjenicom da su se promjene detektirane MLPA metodom nalazile blizu mjesta hibridizacije probe te su se interpretirala kao delecija, a moguće da je riječ o SNP-u.

Pregledom literature koja navodi upotrebu aCGH tehnike u evaluaciji ispitanika s MZ-om, postotak detektiranih patogenih aberacija kreće se između 15 – 20 % (231, 232). Postotak detektiranih patogenih aberacija u provedenom istraživanju iznosi 18,5 % (5/27), dok je postotak vjerojatno benignih i VOUS aberacija nešto veći i iznosi 25,9 % (7/27). U studiji provedenoj u Finskoj na 150 pacijenata s idiopatskim MZ-om patogene varijante su utvrđene u 28 (18,6 %) pacijenata (233). Studija provedena na Tajvanu provedena na 177 ispitanika s MZ-om utvrdila je veliku stopu patogene varijante u čak 57 ispitanika. Schoumans i suradnici u studiji provedenoj na 41 ispitanika s MZ-om utvrdili kromosomske aberacije u 9,8 % pacijenata (234). Sve veća rezolucija platforma povećava broj detektiranih aberacija s nesigurnim/nepoznatim utjecajem na fenotip što predstavlja izazov u utvrđivanju patogenih aberacija u podlozi MZ-a. Prema literaturi analiza detektiranih promjena u broju kopija DNA temelji se na pretraživanju bioinformatičkih baza podataka i utvrđivanju da li je detektirana aberacija prisutna kao varijacija u broju kopija kod normalnih osoba, te da li postoje objavljeni slučajevi s istim aberacijama i uputnim dijagnozama. Obzirom na sve veću rezoluciju istraživanja humanog genoma veliki izazov predstavlja interpretacija detektiranih promjena u

broju kopija, što se osobito odnosi na VOUS. Promjene u klasifikaciji su posljedica kombinacije različitih faktora među kojima su: novi literaturni podatci koji razjašnjavaju fenotipske posljedice CNV-ova što uključuje redefiniranje najmanje kritične regije mikrodelecijskih/mikroduplikacijskih sindroma, novi dokazi o funkcionalnim učincima CNV-ova, otkrivanje novih kandidat gena u podlozi neurorazvojnih poremećaja upotrebom molekularnih tehnika i NGS-om. Uzimajući sve navedeno, interpretacija metode kromosomske analize na mikropostroju u nekim slučajevima još uvijek predstavlja izazov.

U istraživanju metoda aCGH je postigla veću stopu otkrivanja potencijalno patogenih varijanti od MLPA. Metoda GTG-pruganja je u našem istraživanju pokazala veću stopu detekcije strukturnih kromosomskih aberacija u odnosu na aCGH. Ovakav nalaz moguće je interpretirati manjim brojem ispitanika kod kojih je učinjen aCGH. Veličinu strukturnih anomalija kromosoma obično je teško definirati samo na temelju klasične citogenetske analize, zbog njegove ograničene razlučivosti, što otežava povezivanje fenotipa i genotipa. No, bez kariotipizacije bilo bi vrlo teško utvrditi mehanizam nastanka balansiranih kromosomskih aberacija, gdje ne možemo isključiti mogućnost njihovog doprinosa etiologiji MZ-a kod ispitanika. Iako aCGH metoda ne otkriva točkaste mutacije, balansirane translokacije, inverzije ili mozaicizam niske razine, stopa dijagnoze u kliničkoj primjeni je 2,5 puta veća od uobičajene analize kariotipizacije.

S obzirom na dostupnost genetičkih analiza, kod djela ispitanika (168/300) uzrok MZ-a će za sada ostati neutvrđen, posebno kod ispitanika s izoliranim MZ-om, gdje su vjerojatan uzrok monogenske promjene koj bi se uvrdile metodom paralelnog sekvenciranja genoma (prema engl. *Next genome sequencing*, NGS). Metoda NGS-a bi nam također pomogla u utvrđivanju intragenskih aberacija kod nekarateriziranih gena detektiranih metodom aCGH, no zbog nedostupnosti navedene analize isto nije učinjeno. Napretkom dijagnostičkih metoda u laboratorijskoj genetici kao što su metoda masivnog paralelnog sekvenciranja koja omogućava sekvenciranje neograničenog broja gena u jednom genetičkom testu u budućnosti će omogućiti detekcijunovih poremećaja povezanih sa MZ-om, ali i drugih genetičkih poremećaja. Važno je znati da interpretacija rezultata NGS testiranja predstavlja veliki dijagnostički izazov, jer će biti važno uspostaviti kvalitetne kliničke smjernice. Izuzetno je važna dobra suradnja između liječnika medicinskog genetičara, laboratorijskog medicinskog genetičara kao i liječnika specijalista u drugim kliničkim područjima, jer je za interpretaciju NGS nalaza često potrebna opsežnija klinička obrada kao i definiranje kliničkog fenotipa i pripadajućih komorbiditeta.

8. Zaključak

Iz ovog istraživanja proizlaze slijedeći zaključci:

- provedeno istraživanje ukazuje da su citogenetičke, molekularno-citogenetičke tehnike i tehnikemolekularne genetike povećale stopu otkrivanja genetičkog uzroka mentalnog zaostajanja, što olakšava definiranje novih genetskih sindroma
- najveći broj aberacija je utvrđen korištenjem citogenetičkih tehnika, s najvećim udjelom numeričkih kromosomskih aberacija
- u slučajevima otkrivanja strukturne aberacije GTG-pruganjem, FISH tehnika je omogućila preciznu karakterizaciju zahvaćenih kromosomskih segmenata, te sadržaja gena zahvaćene regije
- FISH tehnikom su utvrđeni poznati mikrodelecijski sindromi
- rezultati provedenog istraživanja ukazuju na važnost potvrde MLPA rezultata drugom tehnikom, s obzirom da metoda aCGH nije potvrdila nalaze MLPA subtelomera
- aCGH tehnika je omogućila utvrđivanje novih genotipova kod djece s mentalnim zaostajanjem i dismorfijom
- rezultati istraživanja upućuju na važnost primjene suvremenih citogenetičkih metoda u genetičkoj evaluaciji osoba s dijagnozom mentalnog zaostajanja

9. Sažetak

Uvod: Mentalno zaostajanje (MZ) zahvaća 2 – 3 % opće populacije, heterogene je etiologije, a smatra se da je u 50 – 60 % slučajeva uzrok genetički, što predstavlja izazov u dijagnostici mentalnog zaostajanja.

Cilj istraživanja: Definirati korelaciju genotip-fenotip kod ispitanika s MZ-om primjenom tehnika citogenetičke, molekularno-citogenetičke i molekularne genetike (GTG-pruganje, FISH, MLPA, aCGH, NGS) čime će se povećati stopa otkrivenih genomskih poremećaja.

Ispitanici i metode: Opservacijsko presječno istraživanje obuhvatilo je 300 djece od 0 do 18 godina života s MZ-om, s dismorfijom i bez nje, pregledanih u Ambulanti za genetiku i na Odjelu za genetiku Klinike za pedijatriju KBC-a Osijek u razdoblju od 2008. do 2018. godine. Deskriptivni podatci prikazani su apsolutnim i relativnim frekvencijama, odnosno udjelima. Opisani su novi fenotipovi te korelacije genotip-fenotip.

Rezultati: Najveći broj kromosomskih aberacija je utvrđen korištenjem citogenetičkih tehnika i to u 29 % (87/300) ispitanika. FISH tehnikom su utvrđeni poznati mikrodelecijski sindromi u 58,6 % (17/29) ispitanika, dok su aCGH tehnikom utvrđene aberacije u 18,5 % (5/27) ispitanika. Molekularno-genetička analiza broja tripleta CGG utvrdila je u 8,7 % (11/126) ispitanika fragilni X sindrom kao uzrok MZ-a.

Zaključak: Kombinacijom uporabe citogenetičkih i molekularnih tehnikao tkriven je veći broj kromosomskih i submikroskopskih aberacija u podlozi MZ-a, što olakšava definiranje novih genetskih sindroma i povezivanje genotipa i fenotipa.

Ključne riječi: aCGH, fenotip, FISH, genotip, GTG, mentalno zaostajanje, MLPA

10. Summary

Background: Mental retardation (MR) affects 2 – 3 % of the general population, it is of heterogeneous etiology, and it is considered to be genetic in 50 – 60 % cases, which is a challenge in the diagnosis of mental retardation.

Objectives: To define genotype-phenotype correlations in patients with MR the pediatric population using cytogenetic and highly sensitive techniques of molecular (cyto) genetics (FISH, MLPA, aCGH, NGS) which will increase the rate of detected genomic disorders.

Subjects and methods: The observational cross-sectional study included 300 children from 0 to 18 years of age with MR with and without dysmorphia examined in the genetics clinic and genetics department, Clinic for Pediatrics, University Hospital Center Osijek in the period from 2008 to 2018. Descriptive data are expressed in absolute and relative frequencies, ie percentages. New phenotypes and genotype-phenotype correlations are described.

Results: The highest number of chromosomal aberrations was determined using cytogenetic techniques in 29 % (87/300) of subjects. FISH technique revealed microdeletion syndromes in 58,6 % (17/29) of subjects, while aCGH determined aberrations in 18,5 % (5/27) of subjects. Molecular genetic analysis of the number of CGG triplets in 8,7 % (11/126) subjects detected fragile X syndrome as a cause of MR.

Conclusion: The combination of cytogenetic and molecular techniques revealed a larger number of chromosomal and submicroscopic aberrations in the MR background, which facilitates the definition of new genetic syndromes and correlation of genotypes and phenotypes.

Keywords: aCGH, FISH, G-banding, genotype, mental retardation, phenotype, MLPA

11. Literatura

1.
2. . Datum pristupa: 6.5.2020.
3. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Međunarodna klasifikacija bolesti i srodnih zdravstvenih problema. 10th ed. Zagreb: Medicinska naklada; 2012.
4. Američka Psihijatrijska Udruga. DSM-IV dijagnostički i statistički priručnik za duševne poremećaje. Zagreb: Naklada Slap; 1998.
5. Wolff M , Johannesen KM. Genetic and phenotypic heterogeneity suggest therapeutic implications in SCN2A related disorders. Brain. 2017;140:1316.
6. SA Mullen, Carvill GL, Copy number variants are frequent in genetic generalized epilepsy with intelectual disability. Neurology. 2013;81: 1597.
7. Drews C, Yeargin-Allsopp M, Decoufle P, Murphy C. Variation in the influence of selected sociodemographic risk factors for mental retardation. Am J Public Health. 1995;85(3):329–34.
8. Durkin H, Hasan K. Prevalence and correlates of mental retardation among children in Karachi, Pakistan. Am J Epidemiol. 1998;147:281-8.
9. Yeargin-Allsopp M, Boyle C. Overview: the epidemiology of neurodevelopmental disorders. Ment Retard Dev Disabil Res Rev. 2002;8(3):113-6.
10. Centers for Disease Control nad Prevention. Dostupno na: http://www.cdc.gov/mentalhealth/about-us.htm. Datum pristupa: 29.5.2020.
11. Sharma S, Kumar R, Kumar B, Sanjeev C, Vipasha K, Vishav C. Indian J Public Health. Prevalence of mental retardation in urban and rural populations of the goiter zone in Northwest India Year. J Neurosci Rural Pract. 2016;60(2):131-137.
12. Raina S, Razdan S, Nanda R. Malnutrition as a cause of mental retardation: A population-based study from Sub-Himalayan India. J Neurosci Rural Pract. 2016;7(3):341-345.
13. Ganguly H. Epidemiological findings on prevalence of mental disorders in India. Indian J Psychiatry. 2000;42:14-20.
14. Leonard H, Wen X. The epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millennium. Ment Retard Dev Disabil Res Rev. 2002;8(3):117-34.
15. Islam S, Durkin M, Zaman S. Socio economic status and the prevalence of mental retardation in Bangladesh. Ment Retard. 1993;31:412-7.

16. Reddy V, Gupta A, Lohiya A, Kharya P. Mental health issues and challenges in India. Indian J Med Res. 2013;3:1-3.
17. Aggarwa S, Bogula V, Mandal K, Kumar R, Phadke S. A etiological spectrum of mental retardation and developmental delay in India. Indian J Med Res. 2012;136:436-44.
18. Durkin M, Hasan Z, Hasan K. Prevalence and correlates of mental retardation among children in Karachi, Pakistan. Am J Epidemiol. 1998;147:281-8.
19. Roeleveld N, Zielhuis G, Gabreëls F. The prevalence of mental retardation: A critical review of recent literature. Dev Med Child Neurol. 1997;39:125-32.
20. Bijou S, Browder J, Danti A, Gerald P, Hardman ML M, Gail O, i sur. The Prevalence of Mental retardation. The National Association for Retarded Citizens - The Arc [Internet]. Dostupno na: www.thearc.org/who-we-are/history/segal-account. Datum pristupa: 28.5.2020.
21. Tomac V, Pušeljić S, Škrlec I, Anđelić M, Kos M, Wagner J. Etiology and the Genetic Basis of Intellectual Disability in the Pediatric Population. South Med J. 2017;1(1):144-153.
22. Emerson E. Poverty and people with intellectual disabilities. Ment Retard Dev Disabil Res Rev. 2007;13:107-113.
23. Kaufman L, Ayub M, Vincent J. The genetic basis of non-syndromic intellectual disability: a review. J Neurodev Disord. 2010;2(4):182-209.
24. Schalock R, Luckasson R. American Association on Mental Retardation's Definition, Classification, and System of Supports and Its Relation to International Trends and Issues in the Field of Intellectual Disabilities. J Policy Pract Intellect Disabil. 2004;1:136-46.
25. McLaren J, Bryson S. Review of recent epidemiological studies of mental retardation: prevalence, associated disorders, and etiology. Am J Ment Retard. 1987;92:243-54.
26. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD). Dostupno na: https://omim.org/. Datum pristupa: 19.3.2020.
27. Curry CJ, Stevenson RE, Aughton D, Byrne J, Carey JC, Cassidy S, i sur. Evaluation of mental retardation: recommendations of a Consensus Conference: American Colege of Medical Gentics. Am J Med Genet. 1997;72:468-77.
28. van Karnebeek CD, Jansweijer MC, Leenders AG, Offringa M, Hennekam RC. Diagnostic investigations in individuals with mental retardation: a systematic literature review of their usefulness. Eur J Hum Genet. 2005;13:6-25.

29. Barišić I, Petković I, Hećimović S. Evaluacija genetičkih uzroka mentalne retardacije. Liječ Vjesn. 2003;125:71-7.
30. Schaffer LG. American College of Medical Genetics guideline on the cytogenetic evaluation of the individual with developmental delay or mental retardation. Genet Med. 2005;650-4.
31. Pinkel D, Segraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, i sur. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. Nat Genet. 1998;20:207-11.
32. Stankiewicz P, Beaudet AL. Use of array CGH in the evaluation of dysmorphology, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation. Curr Opin Genet. 2007;17:182-92.
33. Kirchhoff M, Pedersen S, Kjeldsen E, Rose H, Dunø M, Kølvraa S, Lundsteen C. Prospective study comparing HR-CGH and subtelomeric FISH for investigation of individuals with mental retardation and dysmorphic features and an update of a study using only HR-CGH. Am J Med Genet. 2004;127:111-7.
34. Mégarbané A, Rave A, Mircher C, Mircher C, Sturtz F, Grattau Y, i sur. The 50th anniversary of the discovery of trisomy 21: The past, present, and future of research and treatment of Down syndrome. Genet Med. 2009;11:611-616.
35. Shaffer L. American College of Medical Genetics Professional Practice and Guidelines Committee. American College of Medical Genetics guideline on the cytogenetic evaluation of the individual with developmental delay or mental retardation. Genet Med. 2005;7(9):650-654.
36. Xu J, Chen Z. Advances in molecular cytogenetics for the evaluation of mental retardation.Am J Med Genet. 2003;117C:15-24.
37. Curry C, Stevenson R, Aughton D, Byrne J, Carey J, Cassidy S et al. Evaluation of mental retardation: recommendations of a Consensus Conference: American Colege of Medical Gentics. Am J Med Genet. 1997;72:468-77.
38. van Karnebeek C, Jansweijer M, Leenders A, Offringa M, Hennekam R. Diagnostic investigations in individuals with mental retardation: a systematic literature review of their usefulness. Eur J Hum Genet. 2005;13:6-25.
39. Topcu M, Yalnizoğlu D. Developmental abnormalities and mental retardation: diagnostic strategy. Handb Clin Neurol. 2013;111:211-7.

40. Tsukada K, Imataka G, Suzumura H, Arisaka O. Better prognosis in newborns with trisomy 13 who received intensive treatments: a retrospective study of 16 patients. Cell Biochem Biophys. 2012;63(3):191-8.
41. Rosa R, Rosa R, Zen P, Graziadio C, Paskulin G. Trisomy 18: review of the clinical, etiologic, prognostic and ethical aspects. Rev Paul Pediatr. 2013;31(1):111-20.
42. Zeuthen E, Nielsen J. Prevalence of Klinefelter's syndrome (47,XXY) in a general male population. J Genet Hum. 1978;26(1):85-97.
43. Cui X, Cui Y, Shi L, Luan J, Zhou X, Han J. A basic understanding of Turner syndrome: Incidence, complications, diagnosis, and treatment. Intractable Rare Dis Res. 2018;7(4):223-228.
44. Stochholm K, Juul S, Juel K, Naeraa R, Gravholt C. Prevalence, Incidence, Diagnostic Delay, and Mortality in Turner Syndrome. Int J Clin Endocrinol Metab. 2006;91(10):3897-3902.
45. Spatz MA. Genetics Home Reference. J Med Libr Assoc. 2004;92(2):282-283.
46. Vissers L, de Vries B, Veltman J. Genomic microarrays in mental retardation: from copy number variation to gene, from research to diagnosis. J Med Genet.2010;47:289-297.
47. Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith M et al. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. Science. 1996;273:494-497.
48. Schmickel R. Contiguous gene syndromes: a component of recognizable syndromes. J Pediatr. 1986;109:231-41.
49. Li Y, Sasaki H. Genomic imprinting in mammals: its life cycle, molecular mechanisms and reprogramming. Cell Res. 2011;21(3):466-73.
50. Thorvaldsen JL, Bartolomei MS. SnapShot: imprinted gene clusters. Cell 2007; 130:958
51. Butler MG. Genomic imprinting disorders in humans: a mini-review. J Assist Reprod Genet. 2009; 26:477-486.
52. Morison IM, Paton CJ, Cleverley SD. The imprinted gene and parent-of-origin effect database. Nucleic Acids Res. 2001;29:275-276
53. Eggermann T, Perez de Nanclares G, Maher E, Temple K, Tümer Z, Monk D, i sur.Imprinting disorders: a group of congenital disorders with overlapping patterns of molecular changes affecting imprinted loci. Clin Epigenet. 2015;7:123.
54. Walter J, Paulsen M . Imprinting and disease. Semin Cell Dev Biol 2003; 14:101-110.
55. De Crescenzo A, Sparago A, Cerrato F, Palumbo O, Carella M, Miceli M, i sur. Paternal deletion of the 11p15.5 centromeric-imprinting control region is associated with

alteration of imprinted gene expression and recurrent severe intrauterine growth restriction. J Med Genet. 2013;50:99-103.

56. Abi Habib W, Azzi S, Brioude F, Steunou V, Thibaud N, Das Neves C, i sur. Extensive investigation of the IGF2/H19 imprinting control region reveals novel OCT4/SOX2 binding site defects associated with specific methylation patterns in Beckwith-Wiedemann syndrome. Hum Mol Genet. 2014;23:5763-73
57. Horsthemke B. Epimutations in human disease. Curr Top Microbiol Immunol. 2006;310:45-59.7
58. O'Connor C. Telomeres of human chromosomes. Nature Education. 2008;1(1):166.
59. Gomez D, Armando R, Farina H, Menna P, Cerrudo C, Ghiringhelli P, i sur. Telomere structure and telomerase in health and disease (review). Int J Oncol. 2012;41:1561
60. Moeschler J, Shevell M. Clinical genetic evaluation of the child with mental retardation or developmental delays. Pediatrics. 2006;117:2304-16.
61. De vries B, Winter R, Schinzel A, Van ravenswaaija-rts C. Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. J Med Genet. 2003;40:385-98.
62. Weise A, Mrasek K, Klein E, Mulatinho M, Llerena J, Hardekopf D et al. Microdeletion and microduplication syndromes. J Histochem Cytochem. 2012;60:346-58.
63. Sharp A, Locke D, McGrath S, Cheng Z, Bailey J, Vallente R et al. Segmental duplications and copy-number variation in the human genome. Am J Hum Genet. 2005;77(1):78-88.
64. Bailey J, Gu Z, Clark R, Reinert K, Samonte R, Schwartz S, i sur. Recent segmental duplications in the human genome. Science. 2002;297:1003-7.
65. Rudd MK. Structural variation in subtelomeres. Methods Mol Biol. 2012;838:137-49
66. Linardopoulou E, Williams E, Fan Y, Friedman C, Young J, Trask B. Human subtelomeres are hot spots of interchromosomal recombination and segmen-tal duplication. Nature. 2005;437:94-100.
67. Trask B, Friedman C, Martin-Gallardo A, Rowen L, Akinbami C, Blankenship J. Members of the olfactory receptor gene family are contained in large blocks of DNA duplicated polymorphically near the ends of human chromosomes. Hum Mol Genet. 1998;7:13-26.
68. Ballif B, Sulpizi S, Lloyd R, Minie S, Theise A, Bejjani B et al. The clinical utility of enhanced subtelomeric coverage in array CGH. Am J Med Genet A. 2007;143:1850-7.
69. Ravnan J, Tepperberg J, Papenhausen P, Lamb A, Hedrick J, Eash D, i sur. Subtelomere FISH analysis of 11 688 cases: an evaluation of the frequency and pattern of sub-

telomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. J Med Genet.2006;43:478-89.

70. Biesecker L. The end of the begin-ning of chromosome ends. Am J Med Genet. 2002;107:263-6.
71. Shao L, Shaw C, Lu X, Sahoo T, Bacino C, Lalani S, i sur. Identifi cation of chromosome abnormalities in subtelomeric regions by microarray analysis: a study of 5,380 cases. Am J Med Genet. 2008;146 A:2242-51.
72. Yagi H, Furutani Y, Hamada H, Sasaki T, Asakawa S, Minoshima S, i sur. Role of TBX1 in human del22q11.2 syndrome. Lancet. 2003;362:1366-73.
73. Kobrynski LJ, Sullivan KE. Velocardiofacial syndrome, DiGeorge syndrome: the chromosome 22q11.2 deletion syndromes. Lancet.2007;370:1443-52.
74. McDonald-McGinn DM, Sullivan KE. Chromosome 22q11.2 deletion syndrome DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome. Medicine (Baltimore).2011;90(1):1-18.
75. Baldini A. DiGeorge's syndrome: a gene at last. Lancet. 2003;362:1342-3.
76. Meechan DW, Maynard TM, Tucker ES, LaMantia AS. Three phases of DiGeorge/22q11deletion syndrome pathogenesis during brain development:patterning, proliferation, and mitochondrial functions of 22q11 genes. Int J Dev Neurosci. 2011;29(3):283-294.
77. Raux G, Bumsel E, Hecketsweiler B, et al. Involvement of hyperprolinemia in cognitive and psychiatric features of the 22q11 deletion syndrome. Hum Mol Genet. 2007;16(1):83-91.
78. Cassidy SB, Dykens E, Williams C. Prader-Willi and Angelman syndromes: Sisterimprinted disorders. Am J Hum Genet. 2000;97: 136-46.
79. Niikawa N. Genomic imprinting and its relevance to genetic diseases. Jpn J HumGenet. 1996; 41: 351-61.
80. Buiting K, Gross S, Lich C, Gillessen-Kaesbach G, el-Maarri O,Horsthemke B. Epimutations in Prader-Willi and Angelman syndromes: a molecular study of 136 patients with an imprinting defect. Am J Hum Genet.2003: 72(3), 571-7.
81. Clayton-Smith J, Laan L. Angelman syndrome: a review of the clinical and genetic aspects. J Med Genet. 2003;40(2), pp. 87-95.
82. Chai JH, Locke DP, Greally JM, Knoll JH, Ohta T, Dunai J, i sur. 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(4),898- 925.

83. Herzing LB, Kim SJ, Cook EH, Ledbetter DH. The human aminophospholipid transporting ATPase gene ATP10C maps adjacent to UBE3A and exhibits similar imprinted expression. Am J Hum Genet. 2001; 68(6), 501-5.
84. Perk J, Makedonski K, Lande L, Cedar H, Razin A, Shemer R. The imprinting mechanism of the Prader-Willi/Angelman regional control center. EMBO J. 2002; 21(21), 5807-14.
85. Rougeulle C, Cardoso C, Fontes M, Colleaux L, Lalande M. An imprinted antisense RNA overlaps UBE3A and a second maternally expressed transcript. Nat Genet. 1998; 19(1), 15-6.
86. Barišić I, Marušić Della Marina B. Genetske osnove razvojnog zaostajanja/mentalne retardacije. Paediatr Croat. 2007;51:191-200.
87. Stiles J, Sabbadini L, Capirci O, Volterra V. Drawing abilities in Williams syndrome: a case study. Dev Neuropsychol. 2000;18(2):213-35.
88. Zhang X, Snijders A, Segraves R, Zhang X, Niebuhr A, Albertson D, i sur.High-resolution mapping of genotype-phenotype relationships in cri du chat syndrome using array comparative genomic hybridization. Am J Hum Genet. 2005;76: 312-326.
89. Gersh M, Goodart SA, Pasztor LM, Harris DJ, Weiss L, Overhauser J. Evidence for a distinct region causing a cat-like cry in patients with 5p deletions. Am J HumGenet. 1995;56:1404-1410.
90. Burgess DL, Jones JM, Meisler MH, Noebels JL. Mutation in the Ca2 channel b-subunit gene Cchb4 is associated with ataxia and seizures in the lethargic (lh) mouse.Cell. 1997; 88: 385-392.
91. 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. 2008;148C: 246-251.
92. Wright TJ, Ricke DO, Denison K, Abmayr S, Cotter PD, Hirschhorn K, i sur. A transcript map of the newly defined 165 kb Wolf-Hirschhorn syndrome critical region. HumMolecGenet. 1997;6: 317-324.
93. South ST, Hannes F, Fisch GS, Vermeesch JR, Zollino M. Pathogenic significance of deletions distal to the currently described Wolf-Hirschhorn syndrome critical regions on 4p16.3. Am J Med Genet C Semin Med Genet. 2008;148C(4):270-4.
94. Simon R, Bergemann AD. Mouse models of Wolf-Hirschhorn syndrome. Am J Med Genet C Semin Med Genet. 2008;148C(4):275-80.

95. Speicher M, Gwyn Ballard S, Ward D. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. Nat Genet. 1996;12:368-375.
96. Liehr T, Heller A, Starke H, Claussen U. FISH banding methods: applications in research and diagnostics. Expert Rev Mol Diagn. 2002;2(3):217-225.
97. Cheung V, Nowak N, Jang W, Kirsch I, Zhao S, Chen X, i sur. Integration of cytogenetic landmarks into the draft sequence of the human genome. Nature. 2001;409:953-958.
98. Xu J, Chen Z. Advances in molecular cytogenetics for the evaluation of mental retardation. Am J Med Genet. 2003;117C:15-24.
99. Knight S, Regan R, Nicod A, Horsley S, Kearney L, Homfray T, i sur. Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. Lancet. 1999;354(9191):1676-81.
100. Colleau L, Rio M, Heuertz S, Moindrault S, Turleau C, Ozilou C, i sur. A novel automated strategy for screening cryptic telomeric rearrangements in children with idiopathic mental retardation. Eur J Hum Genet. 2001;9:319-27.
101. Yu S, Bake E, Hinton L, Eyre H, Waters W, Higgins S, i sur. Frequency of truly cryptic subtelomere abnormalities--a study of 534 patients and literature review. Clin Genet. 2005;68:436-41.
102. Jala S, Harwood A, Sekhon G, Pham Lorentz C, Ketterling R, Babovic-Vuksanovic D, i sur. Utility of subtelomeric fluorescent DNA probes for detection of chromosome anomalies in 425 patients. Genet Med. 2003;5:28-34.
103. van Karnebeek C, Koevoets C, Sluijter S, Bijlsma E, Smeets D, Redeker E, i sur. Prospective screening for subtelomeric rearrangements in children with mental retardation of unknown aetiology: the Amsterdam experience. J Med Genet. 2002;39:546-53.
104. Schouten P, McElgunn J, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. Nucleic Acids Res. 2002;30(12):e57.
105. Rana K, Holla R. To determine the frequency of subtelomeric abnormalities in children with idiopathic mental retardation. Med J Armed Forces India. 2011;(4):326-328.
106. Nygren O, Ameziane N, Duart M, Vijzelaar N, Waisfisz Q, Hess J, i sur. Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. Nucleic Acids Res. 2005;33(14):e128.
107. Northrop EL, Ren H, Bruno DL, McGhie JD, Coffa J, Schouten J, i sur. Detection of cryptic subtelomeric chromosome abnormalities and identification of anonymous

chromatin using a quantitative multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay. Hum Mutat. 2005;26(5):477-86.

108. Rooms L, Reyniers E, van Luijk R, Storm K, Scheers S, Wauters J, i sur. Subtelomeric deletions detected in patients with idiopathic mental retardation using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). Hum Mutat. 2004;23(1):17-21.
109. Rooms L, Reyniers E, Wuyts W, Storm K, van Luijk R, Scheers S, i sur. Multiplex ligation-dependent probe amplification to detect subtelomeric rearrangements in routine diagnostics. Clin Genet. 2006;69:58-64.
110. Palomares M, Delicado A, Lapunzina P, Arjona D, Amiños C, Arcas J, i sur. MLPA vs multiprobe FISH: comparison of two methods for the screening of subtelomeric rearrangements in 50 patients with idiopathic mental retardation. Clin Genet.2006;69:228-33.
111. de Vries B, Winter R R, Schinzel A, van Ravenswaaij-Arts C. Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. J Med Genet. 2003;40:385-98.
112. Flint J, Wilkie A, Buckle V, Winter R, Holland A, McDermid HE H. The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. Nat Genet. 1995;9:132-40.
113. Koolen D, Nillesen W, Versteeg M, Merkx G, Knoers N, Kets M, i sur. Screening for subtelomeric rearrangements in 210 patients with unexplained mental retardation using multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). J Med Genet. 2004;41:892-899.
114. Pinkel D, Segraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, i sur. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. Nat Genet. 1998;20:207-11.
115. Ishkanian A, Malloff C, Watson S, DeLeeu R, Chi B, Coe B, i sur. A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome. Nat Genet. 2004;36:299-303.
116. Vissers L, de Vries B, Osoegawa K, Janssen I, Feuth T, Choy C, i sur. Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. Am J Hum Genet. 2003;73:1261-70.
117. Shaw-Smith C, Redon R, Rickman L, Rio M, Willatt L, Fiegler H, i sur. Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. J Med Genet. 2004;41:241-8.

118. Schoumans J, Ruivenkamp C, Holmberg E, Kyllerman M, Anderlid B, Nordenskjöld M. Detection of chromosomal imbalances in children with idiopathic mental retardation by array based comparative genomic hybridisation (array-CGH). J Med Genet. 2005;42:699-705.
119. Menten B, Maas N, Thienpont B, Buysse K, Vandesompele J, Melotte C, i sur. Emerging patterns of cryptic chromosomal imbalance in patients with idiopathic mental retardation and multiple congenital anomalies: a new series of 140 patients and review of published reports. J Med Genet. 2006;43:625-33.
120. Miyake N, Shimokawa O, Harada N, Sosonkina N, Okubo A, Kawara H, i sur. BAC array CGH reveals genomic aberrations in idiopathic mental retardation. Am J Med Genet A. 2006;140:205-11.
121. Stankiewicz P, Beaudet A. Use of array CGH in the evaluation of dysmorphology, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation. Curr Opin Genet Dev. 2007;17:182-92.
122. Sneddon TP, Church DM. Online resources for genomic structural variation. Methods Mol Biol. 2012;838:273-89.
123. Conrad DF, Pinto D, Redon R, Feuk L, Gokcumen O, Zhang Y, i sur. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. Nature. 2010;464(7289):704-12.
124. Boone PM, Bacino CA, Shaw CA, et al. Detection of clinically relevant exonic copy-number changes by array CGH. Hum Mutat. 2010;31:1326-1342.
125. Rosenberg C, Knijnenburg J, Bakker E, Vianna-Morgante A, Sloos W, Otto P, i sur.Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: clinical significance of imbalances present both in affected children and normal parents. J Med Genet. 2006;43(2):180-6.
126. Giorgio E, Ciolfi A, Biamino E, Caputo V, Di Gregorio E, Belligni E,i sur. Whole exome sequencing is necessary to clarify ID/DD cases with de novo copy number variants of uncertain significance: Two proof-of-concept examples. Am J Med Genet Part A.2016;170(7):1772-9.
127. Rosenfeld J, Patel A. Chromosomal Microarrays: Understanding Genetics of Neurodevelopmental Disorders and Congenital Anomalies. J Pediatr Genet. 2016;6(1):042-50.

128. Mattioli F. Identification of novel genetic causes of monogenic intellectual disability. Neurobiology. Université de Strasbourg [Internet]. Dostupno na: https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01963143/document. Datum pristupa:10.2.2020.
129. McKenzie K, Milton M, Smith G. Systematic review of the prevalence and incidence of intellectual disabilities: current trends and issues. Curr Dev Disord Rep. 2016;3:104–115.
130. Wieczorek D. Autosomal dominant intellectual disability. Med Genet. 2018;30(3):318-322.
131. Large-scale discovery of novel genetic causes of developmental disorders.Deciphering Developmental Disorders Study. Nature. 2015;519(7542):223-8.
132. Vorstman JA, Ophoff RA. Genetic causes of developmental disorders. Curr Opin Neurol. 2013;26(2):128-36.
133. Lelieveld S, Reijnders M, Pfundt R, Yntema H, Kamsteeg E, de Vries P, i sur. Meta-analysis of 2104 trios provides support for 10 new genes for intellectual disability. Nat Neurosci. 2016;19:1194-1196.
134. Kochinke K, Zweier C, Nijho B, Fenckova M, Cizek P, Honti F, i sur. Systematic phenomics analysis deconvolutes genes mutated in intellectual disability into biologically coherent modules. Am J Hum Genet. 2016;98:1249-164.
135. DDDS Large-scale discovery of novel genetic causes of developmental disorders. Nature. 2015;519:223-228.
136. Posey JE, Harel T, Liu P. Resolution of disease phenotypes resulting from multilocus genomic variation. N Engl J Med. 2017;376(1):21-31.
137. Vissers LE, Gilissen C, Veltman JA. Genetic studies in intellectual disability and related disorders. Nat Rev Genet. 2016;17:9-18.
138. Deciphering Developmental Disorders Study Prevalence and architecture of de novo mutations in developmental disorders. Nature. 2017;542:433-438.
139. Goldmann JM, Wong WS, Pinelli M, Farrah T, Bodian D, Stittrich AB, i sur. Parent-of-origin-specific signatures of de novo mutations. Nat Genet. 2016;48(8):935-9.
140. Genetics of early onset cognitive impairment.Ropers HH. Annu Rev Genomics. Hum Genet. 2010;11:161-87.
141. Hu H, Kahrizi K, Musante L, Fattahi Z, Herwig R, Hosseini M, i sur. Genetics of intellectual disability in consanguineous families. Mol Psychiatry. 2018;140.
142. Musante L, Ropers H. Genetics of recessive cognitive disorders. Trends Genet. 2014;30(1):32-39.

143. Harripaul R, Vasli N, Mikhailov A, Rafiq MA, Mittal K, Windpassinger C, i sur. Mapping autosomal recessive intellectual disability. Combined microarray and exome sequencing identifies 26 novel candidate genes in 19consanguineous families. Mol Psychiatry. 2018;23(4):973-984.
144. Stevenson R, Schwartz C. Clinical and molecular contributions to the understanding of X-linked mental retardation. Cytogenet Genome Res. 2002;99(1-4):265-75.
145. Egle P, Laima A, Zivile M, Ausra M, Loreta C, Tautvydas R, i sur. Identification of genetic causes of congenital neurodevelopmental disorders using genome wide molecular technologies. Acta Med Litu. 2016;23(2):73-85.
146. Ropers H, Hamel B. X-linked mental retardation. Nat Rev Genet. 2005;6(1):46-57.
147. Chen W, Jensen LR, Gecz J, Fryns JP, Moraine C, de Brouwer A, i sur. Mutation screening of brain-expressed X-chromosomal miRNA genes in 464 patients with nonsyndromic X-linked mental retardation. Eur J Hum Genet. 2007 Mar;15(3):375-8.
148. Pandey UB, Mittal B. Molecular basis of X-linked non-specific mental retardation. Indian J Exp Biol. 2004;42(6):549-57.
149. Chelly J, Khelfaoui M, Francis F, Chérif B, Bienvenu T. Genetics and pathophysiology of mental retardation. Eur J Hum Genet. 2006;14(6):701-13.
150. Martin J, Bell J. A pedigree of mental defect showing sex-linkage. J Neurol Psychiatry.1943;6(3–4):154–7.
151. Ciaccio C, Fontana L, Milani D, Tabano S, Miozzo M, Esposito S. Fragile X syndrome: a review of clinical and molecular diagnoses. Ital J Pediatr. 2017;43:39.
152. Hunter J, Rivero-Arias O, Angelov A, Kim E, Fotheringham I, Leal J. Epidemiology of fragile X syndrome: a systematic review and meta-analysis. Am J Med Genet A.2014;7:1648-58.
153. Hagerman R, Hagerman P. Fragile X Syndrome: diagnosis, treatment and research. Baltimore:The John Hopkins University Press. 2002;152.
154. Nichol K, Pearson C. CpG methylation modifies the genetic stability of cloned repeat sequences. Genome Res. 2002;12(8):1246-56.
155. Lambert S, Maystadt I, Boulanger S, Vrielync P, Destrée A, Lederer D, i sur. Expanding phenotype of p.Ala140Val mutation in MECP2 in a 4 generation family with X-linked intellectual disability and spasticity. Eur J Med Genet. 2016;59(10):522-5.
156. Shah RR, Bird AP. MeCP2 mutations: progress towards understanding and treating Rett syndrome. Genome Med. 2017;9(1):17.

157. Battaglia A, Carey J. Diagnostic evaluation of developmental delay/mental retardation: An overview. Am J Med Genet C Semin Med Genet. 2003;117C(1):3-14.
158. Ropers H. Genetics of early onset cognitive impairment. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2010;11:161-87.
159. Bradley EA, Thompson A, Bryson SE. Mental retardation in teenagers: prevalence data from the Niagara region, Ontario. Can J Psychiatry. 2002;47(7):652-9.
160. Van Karnebeek CD, Jansweijer MC, Leenders AG, Offringa M, Hennekam RC. Diagnostic investigations in individuals with mental retardation: a systematic literature review of their usefulness. Eur J Hum Genet. 2005;13(1):6-25.
161. Cernakova I, Kvasnicova M, Lovasova Z, Badova N, Drabek J, Bouchalova K, i sur. A duplication dup(4)(q28q35.2) de novo in a newborn. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2006;150(1):113-6.
162. Francisco-Bagnariolli AM, Payão SL, Kawasaki-Oyama RS, Sabbag Filho D, Segato R, de Labio RW, Chauffaille ML, Priest JH. High risk for unbalanced segregation of some reciprocal translocations: a large pedigree containing distal 4q trisomy from t(4;7)(q28;p22). Am J Med Genet. 2001;103(4):302-7.
163. Skrlec I, Wagner J, Puseljić S, Heffer M, Stipoljev F. Partial monosomy 2p and partial trisomy 4q due to paternal translocation t(2;4)(p25.1;q31.3). Coll Antropol. 2014;38(2):759-62.
164. Francis G, Flannery D, Byrd J, Fisher S. An apparent de novo terminal deletion of chromosome 2 (pter/p24:). J Med Genet. 1990;27:137e8.
165. Lo-Castro A, Giana G, Fichera M, Castiglia L, Grillo L. Deletion 2p25.2: A cryptic chromosome abnormality in a patient with autism and mental retardation detected using aCGH. Eur J Med Genet. 2009;52:67-70.
166. Kim JW, Park JY, Oh AR, Choi EY, Ryu HM, Kang IS, i sur. Duplication of intrachromosomal insertion segments 4q32→q35 confirmed by comparative genomic hybridization and fluorescent in situ hybridization.Clin Exp Reprod Med. 2011;38(4):238-241.
167. Pillai-Kastoori L, Wen W, Morris AC.Keeping an eye on SOXC proteins. Dev Dyn. 2015;244:367-76.
168. Amir Im, Al-Tawil Ki, Al-Hathal Mm.Deletion (2)(p14p15) in a child with severe neurodevelopmental delay. J Med Genet. 2000;37**:**e21.

169. Mégarbané A, Gosset P, Souraty N, Lapierre JM, Korban R, Zahed L, i sur. Chromosome 10p11.2-p12.2 duplication: report of a patient and review of the literature. Am J Med Genet. 2001;104(3):204-8.
170. Fryns JP, Deroover J, Haegeman J. Partial duplication of the short arm of chromosome 10. Hum Genet.1979;47,217-220.
171. Kulharya AS, Schneider NR, and Wilson GN. Three cases of dup(10p)/del(10q) syndrome resulting from maternal pericentric inversion. Am J Med Genet. 1993;47:817-9.
172. Fechtrup B, Kalhoff H, Diekmann L, Fritz B. Trisomie des kurzen Arms von Chromosom 10p; Beschreibung einer Patientin mit de novo Duplikation 10p11.2-15 [Trisomy of the short arm of chromosome 10p; description of a female patient with de novo duplication 10p11.2-15]. Klin Padiatr. 2000;212(1):35-40.
173. Moog U, Smeets EEJ, van Roozendaal KEP, Schoenmakers S, Herbergs J, Schoonbrood-Lenssen AMJ, i sur. Neurodevelopmental disorders in males related to the gene causing Rett syndrome in females (MECP2). Europ J Paediat Neurol. 2003;7:5-12.
174. Sirianni N, Naidu S, Pereira J, Pillotto RF, Hoffman EP. Rett syndrome: confirmation of X-linked dominant inheritance, and localization of the gene to Xq28. (Letter) Am J Hum Genet. 1998;63:1552-1558.
175. Erlandson A, Samuelsson L, Hagberg B, Kyllerman M, Vujic M, Wahlström J. Multiplex ligationdependent probe amplification (MLPA) detects large deletions in the MECP2 gene of Swedish Rett syndrome patients. Genet Test. 2003;7(4):329-332.
176. Ravn K, Nielsen JB, Skjeldal OH, Kerr A, Hulten M, Schwartz M. Large genomic rearrangements in MECP2. Hum Mutat. 2005;25(3):324.
177. Bebbington A, Downs J, Percy A, i sur. The phenotype associated with a large deletion on MECP2. Eur J Hum Genet. 2012;20(9):921-927.
178. Wentzel C, Fernström M, Ohrner Y, Annerén G, Thuresson AC. Clinical variability of the 22q11.2 duplication syndrome. Eur J Med Genet. 2008;51(6):501-10.
179. Edelmann L, Pandita RK, Spiteri E, Funke B, Goldberg R, Palanisamy N, i sur. A common molecular basis for rearrangement disorders on chromosome 22q11. Hum Molec Genet. 1999;8:1157-1167.
180. Ramer JC, Mowrey PN, Robins DB, Ligato S, Towfighi J, Ladda RL. Five children with del (2)(q31q33) and one individual with dup (2)(q31q33) from a single family: Review of brain, cardiac, and limb malformations. Am J Med Genet. 1990.37:392–400.

181. Biljsma EK, Knegt AC, Bilardo CM. Goodman FR. Increased nuchal translucency and split-hand/foot malformation in a fetus with an interstitial deletion of chromosome 2q that removes the SHFM5 locus. Prenat. Diagn. 2005;25:39-44.
182. Del Campo M, Jones MC, Veraksa AN, Curry CJ, Jones KL, Mascarello JT, i sur. Monodactylous limbs and abnormal genitalia are associated with hemizygosity for the human 2q31 region that includes the HOXD cluster. Am J Hum Genet. 1999;65:104-110.
183. MacLean JE, Teshima IE, Szatmari P, Nowaczyk MJ. Ring chromosome 22 and autism: report and review. Am J Med Genet. 2000;90:382-5.
184. Stewart A, Richards BW. A note on a patient with a ring-22 chromosome identified by banding. J Ment Defic Res.1976;20:95-8.
185. De Mas P, Chassaing N, Chaix Y, Vincent MS, Julia S,Bourrouillou G. Molecular characterisation of a ring chromosome 22 in a patient with severe language delay: a contribution to the refinement of the subtelomeric 22q deletion syndrome. J Med Genet. 2002;39:e17.
186. Praphanphoj V, Goodman BK, Thomas GH, Raymond GV. Cryptic subtelomeric translocations in the 22q13 deletion syndrome. J Med Genet.2000;37:58-61.
187. Hutchinson R, Wilson M, Voullaire L. Distal 8p deletion (8p23.1----8pter): a common deletion? J Med Genet. 1992;29(6):407-11.
188. Khelifa HB, Kammoun M, Hannachi H. Microarray Analysis of 8p23.1 Deletion in New Patients with Atypical Phenotypical Traits. J Pediatr Genet. 2015;4(4):187-193.
189. Erin P. Carmany, Erawati V. Bawle. Microduplication of 4p16.3 due to an unbalancedtranslocation resulting in a mild phenotype. Am J Med Genet.2011;155,4,819-824.
190. D'Amato Sizonenko LD, Ng D, Oei P, Winship I. Supernumerary marker chromosome 5:confirmation of a critical region and resultant phenotype. Am J Med Genet. 2002;111:19-26.
191. Loscalzo ML, Becker TA, Stucliffe M. A patient with an interstitial duplication of chromosome 5p11-p13.3 further confirming a critical region for 5p duplication syndrome. Eur J Med Genet. 2008;51:54–60.
192. Gunnarsson C, Foyn Bruun C. Molecular characterization and clinical features of a patient with an interstitial deletion of 3p25.3–p26.1. Am J Med Genet. 2010. Part A152A:3110-3114.

193. Riess A, Grasshoff U, Schaferhoff K, Bonin M, Riess O, Horber V, Tzschach A. Interstitial 3p25.3–p26.1 deletion in a patient with intellectual disability. Am J Med Genet.2012;Part A 158A:2587-2590.
194. Peltekova IT, Macdonald A, Armour C. Microdeletion on 2p25 in a patient features of 3p deletion syndrome. Am J Med Genet.2012. Part A 158A:2583-2583.
195. Grozeva D, Carss K, Spasic-Boskovic O, Parker MJ, Archer H, Firth HV, i sur. De novoloss-of-function mutations in SETD5, encoding a methyltransferase in a 3p25 microdeletion syndrome critical region, cause intellectual disability. Am J Hum Genet. 2014;94:618-624.
196. Rivas F, Rivera H, Plascencia ML, et al. The phenotype in partial 13q trisomies, apropos of a familial (13;15)(q22;q26) translocation. Hum Genet. 1984:67;86-93.
197. Tharapel SA, Lewandowski RC, Tharapel AT, Wilroy RS Jr. Phenotype-karyotype correlation in patients trisomic for various segments of chromosome 13. J Med Genet.1986;23(4):310-315.
198. Dutrillaux B, Jonasson J, Laurkn K, Lejeune J, Lindsten J, Petersen GB, Saldaiia-Garcia P. An unbalanced 4q/21q translocation identified by the R but not by the G and Q chromosome banding techniques. Ann Genet. 1973;16:11-16.
199. Sandig KR, Mücke J. U. The partial 4q monosomy. Eur JPediatr.1982; 138, 254–257.
200. Funderburk SJ, Spence MA, Sparkes RS. Mental retardation associated with “balanced” chromosome rearrangements. Am J Hum Genet.1977; 29:136-141.
201. Fryns JP, Kleczkowska A, Kubiej E, Berghe H. Excess of mental retardation and/or congenital malformation in reciprocal translocations in man. Hum Genet.1986; 72:1–8.
202. Hussain MS, Baig SM, Neumann S, Peche VS, Szczepanski S, Nurnberg G, i sur.CDK6 associates with the centrosome during mitosis and is mutated in a large Pakistani family with primary microcephaly. Hum Molec Genet.2013; 22: 5199-5214.
203. Dammeyer J. Children with Usher syndrome: mental and behavioral disorders. Behav Brain Funct. 2012;8:16.
204. Nakashima M, Takano K, Osaka H, Aida N, Tsurusaki Y, Miyake N, i sur. Causative novel PNKP mutations and concomitant PCDH15 mutations in a patient withmicrocephaly with early-onset seizures and developmental delay syndrome and hearing loss. J Hum Genet. 2014;59(8):471-4.
205. Leka-Emiri S, Petrou V, Manolakos E, Thomaidis L, Fotinou A, Vlachopapadopoulou E, i sur. 17p13.1 Microduplication Syndrome in a Child, Familial Short Stature, and Growth

Hormone Deficiency: A Case Report and Review of the Literature. Mol Syndromol. 2018;9(6):300-305.

206. Belligni E, Di Gregorio E, Biamino E, Calcia A, Molinatto C, Talarico F, i sur. 790 Kb microduplication in chromosome band 17p13.1 associated with intellectual disability, afebrile seizures, dysmorphic features, diabetes, and hypothyroidism. Eur J Med Genet. 2012;55(3):222-224.
207. Coutton C, Devillard F, Vieville G, Amblard F, Lopez G, Jouk P,i sur. 17p13.1 microduplication in a boy with Silver-Russell syndrome features and intellectual disability. Am J Med Genet. 2012;158A(10):2564-2570.
208. Maini I, Ivanovski I, Iodice A, Rosato S, Pollazzon M, Mussini M,i sur. Endocrinological Abnormalities Are a Main Feature of 17p13.1 Microduplication Syndrome: A New Case and Literature Review. Mol Syndromol. 2016;7(6):337-343.
209. Kuroda Y, Ohashi I, Tominaga M, Saito T T, Nagai J, Ida K,i sur. De novo duplication of 17p13.1-p13.2 in a patient with intellectual disability and obesity. Am J Med Genet. 2014;164A(6):1550-1554.
210. Mooneyham K, Holden K, Cathey S, Dwivedi A, Dupont B, Lyons M. Neurodevelopmental delays and macrocephaly in 17p13.1 microduplication syndrome. Am J Med Genet. 2014;164(11):2887-2891.
211. Carvalho C, Vasanth S, Shinawi M, Russell C, Ramocki M, Brown C,i sur. Dosage Changes of a Segment at 17p13.1 Lead to Intellectual Disability and Microcephaly as a Result of Complex Genetic Interaction of Multiple Genes. Am J Hum Genet.2014;95(5):565-578.
212. Beunders G, Voorhoeve E, Golzio C, Pardo LM, Rosenfeld JA, Talkowski ME, i sur. Exonic deletions in AUTS2 cause a syndromic form of intellectual disability and suggest a critical role for the C terminus. Am J Hum Genet. 2013;92:210-220.
213. Kalscheuer VM, FitzPatrick D, Tommerup N, Bugge M, Niebuhr E, Neumann L, i sur. Mutations in autism susceptibility candidate 2 (AUTS2) in patients with mental retardation**.** Hum. Genet. 2007;121:501-509.
214. Frangiskakis JM, Ewart AK, Morris CA, Mervis CB, Bertrand J, Robinson BF, i sur.LIM-kinase1 hemizygosity implicated in impaired visuospatial constructive cognition. Cell. 1996;12;86(1):59-69.
215. Sun M, Zhang H, Li G. 16p13.3 duplication associated with non-syndromic pierre robin sequence with incomplete penetrance. Mol Cytogenet. 2014;7,76.

216. Ramalingam A, Zhou XG, Fiedler S. 16p13.11 duplication is a risk factor for a wide spectrum of neuropsychiatric disorders. J Hum Genet. 2011;56:541-544.
217. Finelli P, Natacci F, Bonati MT, Gottardi G, Engelen JJM, de Die-Smulders CEM, i sur. FISH characterisation of an identical (16)(p11.2p12.2) tandem duplication in two unrelated patients with autistic behaviour. J Med Genet. 2004;41:e90.
218. Mefford HC, Clauin S, Sharp AJ, Moller RS, Ullmann R, Kapur R, i sur. Recurrent reciprocal genomic rearrangements of 17q12 are associated with renal disease, diabetes, and epilepsy**.** Am J Hum Genet. 2007;81:1057-1069.
219. Mencarelli MA, Katzaki E, Papa FT, Sampieri K, Caselli R, Uliana V,i sur.Private inherited microdeletion/microduplications: implications in clinical practice. Europ J Med Genet. 2008;51:409-416.
220. Nagamani SC, Erez A, Shen J, Li C, Roeder E, Cox S, i sur.Clinical spectrum associated with recurrent genomic rearrangements in chromosome 17q12**.** Europ J Hum Genet. 2010;18:278-284.
221. Caselli R, Ballarati L, Selicorni A, Milani D, Maitz S, Valtorta C, i sur. 12.4 Mb duplication of 17q11.2q12 in a patient with psychomotor developmental delay and minor anomalies**.** Europ J Med Genet. 2010;53:325-328.
222. Shiue CN, Lin YH, Kuan LC, Lii LM, Tsai WH, Chen YJ, i sur. Cytogenetic surveillance of mentally-retarded school children in southern Taiwan. J Formos Med Assoc. 2004;103(3):218-224.
223. Coco R, Penchaszadeh VB. Cytogenetic findings in 200 children with mental retardation and multiple congenital anomalies of unknown cause. Am J Med Genet. 1982;12(2):155-173.
224. Schreppers-Tijdink GA, Curfs LM, Wiegers A, Kleczkowska A, Fryns JP. A systematic cytogenetic study of a population of 1170 mentally retarded and/or behaviourly disturbed patients including fragile X-screening. The Hondsberg experience. J Genet Hum. 1988;36(5):425–446.
225. van Karnebeek CD, Koevoets C, Sluijter S, Bijlsma EK, Smeets DF, Redeker EJ, i sur. Prospective screening for subtelomeric rearrangements in children with mental retardation of unknown aetiology: the Amsterdam experience. J Med Genet. 2002;39(8):546–553.
226. Bocian E, Mazurczak T, Stańczak H. Cytogenetic studies in clinical diagnosis analysis of 1611 examination results. Przegl Lek. 1995;52(1):5-9.

227. Ravnan JB, Tepperberg JH, Papenhausen P. Subtelomere FISH analysis of 11 688 cases: an evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. J Med Genet. 2006;43(6):478-89.
228. Laczmańska I, Jakubiak A, Ślęzak R, Pesz K, Stembalska A, Laczmański L, i sur. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) as a screening test in children with developmental defects and intellectual disability of unknown etiology. Med Wieku Rozw. 2011;15:132–9.
229. Li MR, Wang XZ, Yang YL, Zhang YH, Xiong H, Bao XH, i sur. Multiplex ligation-dependent probe amplification analysis of subtelomeric chromosome rearrangements in children with idiopathic mental retardation. Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 2009;89:2839–41.
230. Wu Y, Ji T, Wang J, Xiao J, Wang H, Li J, i sur. Submicroscopic subtelomeric aberrations in Chinese patients with unexplained developmental delay/mental retardation. BMC Med Genet. 2010;11:72.
231. Palomares M, Delicado A, Lapunzina P, Arjona D, Aminoso C, Arcas J, i sur. MLPA vs multiprobe FISH: comparison of two methods for the screening of subtelomeric rearrangements in 50 patients with idiopathic mental retardation. Clin Genet. 2006;69(3):228-33.
232. Miller DT, Adam MP, Aradhya S. Consensus statement: chromosomal microarray is a firsttier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. Am J Hum Genet. 2010;86(5):749-764.
233. Battaglia A, Doccini V, Bernardini L, i sur. Confirmation of chromosomal microarray as a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental delay, intellectual disability, autism spectrum disorders and dysmorphic features. Eur J Paediatr Neurol. 2013;17(6):589-599.
234. Siggberg L, Ala-Mello S, Jaakkola E, Kuusinen E, Schuit R, Kohlhase J, i sur. Array CGH in molecular diagnosis of mental retardation - A study of 150 Finnish patients. Am J Med Genet A. 2010;152A(6):1398-410.
235. Schoumans J, Ruivenkamp C, Holmberg E. Detection of chromosomal imbalances in children with idiopathic mental retardation by array based comparative genomic hybridisation (array-CGH). J Med Genet. 2005;42:699-705.

12. Životopis

Osobni podaci:

Ime i prezime: Višnja Tomac

Adresa: Sv.L.B.Mandića 151, Osijek

Tel: +385 98 917 87 94

e-mail: visnja.tomac@yahoo.com

Datum rođenja: 10.11.1983.

Obrazovanje:

1998. – 2002. I. gimnazija Osijek

2002. – 2008. Medicinski fakultet Osijek

2010. – danas: Poslijediplomski doktorski studij "Biomedicina i zdravstvo", Medicinski fakultet Osijek

Zaposlenje:

2008. – 2009. Klinički bolnički centar Osijek, pripravnički staž

2010. – 2014. Klinički bolnički centar Osijek, specijalizant pedijatrije

2016. - 2018. Klinički bolnički centar Osijek, pedijatar, odjelni liječnik, Zavod za neurologiju, genetiku, reumatologiju i endokrinologiju s bolestima metabolizma, Klinika za pedijatriju

2016. – danas: Medicinski fakultet Osijek, asistent na Katedri za pedijatriju

2018. – danas: Klinički bolnički centar Osijek, pedijatar, genetičar, Zavod za neurologiju, genetiku, reumatologiju i endokrinologiju s bolestima metabolizma, Klinika za pedijatriju

Članstva:

Hrvatsko društvo za humanu genetiku

Hrvatsko društvo za rijetke bolesti

Hrvatsko pedijatrijsko društvo

Znanstvena i stručna djelatnost:

Objavljeni znanstveni radovi:

1. Tomac V, Pušeljić S, Wagner J, Kos M, Arambašić N, Damašek M. CytogeneticFindings in Children With Dysmorphic Features and Intellectual Disability/Mental Retardation in Eastern Croatia.South Med J.2020;4(1);88-95.

2. Tomac V, Pušeljić S, Škrlec I, Anđelić M, Kos M, Wagner J. Etiology and the Genetic Basis of Intellectual Disability in the Pediatric Population. South Med J. 2017;1(1):144-153.

3.Tomic A, Pušeljić S, Tomac V.Characteristics of Thyroid Disease in Pediatric Population. South Med J. 2020;4(2);77-87.

4. Milas AM, Pušeljić S,Arambašić J, Šapina M, TomacV.Early Vital Indicators of Newborns Born After Medically Assisted Reproduction. South Med J. 2020;4(2);88-96.

5. Serdarušić I, Pušeljić S, Tomac V, Romić M.Validity of Neuroimaging in Juvenile Headaches.South Med J. 2020;4(2);69-76.

Sažeci u zbornicima i časopisima

1. Pušeljić, Silvija; Tomac, Višnja; Milas, Diana; Milas, Vesna. Marshall syndrome Autism, profunf intelectual disability, hearing loss and ambliiopia - CASE REPORT. // International Sociiety for Applied Biiological Science, Program and Abstracts Zagreb: Grafički zavod Hrvatske d.o.o., 2017. str. 303-303 (poster, međunarodna recenzija,sažetak,znanstveni)

2. Škrlec, Ivana; Anđelić, Mirna; Teran, Nataša; Hodžić, Alenka; Tomac, Višnja; Štibi, Sanela; Pušeljić, Silvija; Peterlin, Borut; Wagner, Jasenka. MLPA analysis in a cohort of patients with intellectual disabilities. // Meeting abstracts from the 11th European Cytogenetics Conference Firenca, Italija: Molecular Cytogenetics, 2017. str. 17-17 doi:10.1186/s13039-017-0319-3 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

3. Škrlec, Ivana; Tomac, Višnja; Pušeljić, Silvija; Galić, Mia; Barišić, Karmela; Wagner, Jasenka. Validation of the Screening Method for Dynamic Mutations in the FMR1 Gene. // 10th ISABS Conference on Forensic and Anthropologic Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine. Dubrovnik, Hrvatska: 10th ISABS Conference on Forensic and Anthropologic Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine, 2017. CSHG 17, 1 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

4. Tomac, Višnja; Pušeljić, Silvija; Wagner, Jasenka; Škrlec, Ivana; Anđelić, Mirna; Čokolić-Petrović, Dunja; Kos, Martina; Pušeljić, Nora; Milas, Diana; Milas, Vesna. A rare de novo duplication 21q22.3 syndrome – case report. // 10th ISABS Conference on Forensic and Anthropologic Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine Dubrovnik, Hrvatska: 10th ISABS Conference on Forensic and Anthropologic Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine, 2017. CSHG 10, 1 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, stručni)

5. Škrlec, Ivana; Štibi, Sanela; Pušeljić, Silvija; Tomac, Višnja; Wagner, Jasenka. Prikaz de novo rijetkog mozaičnog translokacijskog slučaja trisomije kromosoma 21. // 4. hrvatski simpozij o rijetkim bolestima, Nacionalna konferencija o rijetkim bolestima s međunarodnim sudjelovanjem. Zagreb, Hrvatska, 2016. P24, 1 (poster, domaća recenzija, sažetak, stručni)

6. Tomac, Višnja; Pušeljić, Silvija; Franjić, Danijel; Heffer, Marija; Wagner, Jasenka; Škrlec, Ivana; Raković, Katarina. SMC1A-kandidatni gene familijarne kongenitalne mikrocefalije-prikaz obitelji. // Paediatria Croatica / Barišić, Ingeborg (ur.). Zagreb: Klinika za dječje bolesti Zagreb, Klaićeva 16, Zagreb, 2016. str. 153-153 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, stručni)

7. Pušeljić, Silvija; Wagner, Jasenka; Škrlec, Ivana; Tomac, Višnja; Milas, Vesna; Štimac,

Maja. Prader Willy sindrom kao rezultat majčine uniparentalne disomije kromosoma 15 – prikaz 15 bolesnika. // Paediatria Croatica.Dubrovnik, Hrvatska, 2014. str. 109-110 (poster, recenziran, sažetak, stručni)

8. Križanović, Korana; Tomac, Višnja; Katić, Marina; Aberle, Neda. Povezanost pretilosti i socioekonomskog statusa sedmogodišnjaka na području Osječko-baranjske županije. // Paediatria Croatica, vol 56, supp 2, 2012. Pula, Hrvatska, 2012. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

9. Katić, Martina; Tomac, Višnja; Aberle, Neda; Križanović, Korana. Učestalost arterijske hipertenzije u sedmogodišnje djece koja žive u urbanim i ruralnim područjima Osječko-baranjske županije. // Paediatria Croatica, vol 56, supp 2, 2012. Pula, Hrvatska, 2012. (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni)

10. Kardum, Darjan; Aberle, Neda; Blašković Kokeza, Jadranka; Milas, Vesna; Sipl, Mirna; Vučemilović, Ivana; Kardum, Željka; Ivanković, Ines, Arambašić, Nikolina; Jović, Marijana; Katić, Martina et al. Epidemiologija bolnih postupaka u djece liječene na Kliničkom odjelu intenzivnog liječenja ugrožene novorođenčadi KBC Osijek. // Paediatria Croatica 2010 ; 54 supplment 2 / Ingeborg Barišić (ur.). Zagreb: Denona d. o. o., 2010. str. 119-119 (poster, domaća recenzija, sažetak, stručni)

11. Aberle, Neda; Katić, Martina; Tomac, Višnja; Sarka J., Josipović M. Prevalence of arterial hypertension and obesity in seven year old children. // Kidney&Blood Pressure Research, vol.33, No 6 / Ines Drenjančević, Bojan Jelaković, Akos Koller (ur.). Basel, Švicarska: Karger, 2010. str. 413-441 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

Druga sudjelovanja na skupovima

1. Tomac, Višnja; Pušeljić, Silvija; Posavi, Ana; Wagner, Jasenka; Škrlec, Ivana. Najčešći uzroci mentalnog zaostajanja djece u klinici za pedijatriju KBC Osijek. // VI. hrvatski kongres humane genetike s međunarodnim sudjelovanjem Split, Hrvatska, 2015. str. 41-41 (poster, domaćarecenzija, sažetak, stručni)

2. Pušeljić, Silvija; Tomac, Višnja; Lovrić, Ivana; Wagner, Jasenka; Škrlec, Ivana Prikaz kliničkih i etioloških obilježja djece s autističnim spektrom poremećaja u klinici za pedijatriju KBC Osijek. // VI. hrvatski kongres humane genetike s međunarodnim sudjelovanjem Split, Hrvatska, 2015. str. 40-40 (poster, domaća recenzija, sažetak, stručni)

3.Wagner, Jasenka; Škrlec, Ivana; Pušeljić, Silvija; Tomac, Višnja; Lovrečić, Luca; Peterlin, Borut . De novo slučaj djelomične tetrasomije 16p. // VI. hrvatski kongres humane genetike s međunarodnim sudjelovanjem Split, Hrvatska, 2015. str. 45-45 (poster, domaća recenzija, sažetak,stručni)

4. Katić, Martina; Tomac, Višnja; Aberle, Neda. Effect of high blood pressure and overweight on plasma lipid levels in seven years old children in eastern Slavonija and Baranja, Croatia. // 21 st European meeting on hypertension and cardiovascular prevention Milano, Italija, 2011. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)