

ĮGIMTOS ŠIRDIES YDOS: GENETINĖ ETIOLOGIJA IR DIAGNOSTIKA

Beata Aleksišienė^{1,2}, Algirdas Utkus^{1,2}, Virgilijus Tarutis^{3,4}

¹ Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Žmogaus ir medicininės genetikos katedra,

² Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų Medicininės genetikos centras,

³ Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Širdies ir kraujagyslių ligų klinika,

⁴ Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų Širdies chirurgijos centras

Raktažodžiai: įgimtos širdies ydos (IŠY), chromosomų persitvarkymai, genų mutacijos, kopijų skaičiaus variantai, vieno nukleotido polimorfizmai.

Santrauka

Įgimtos širdies ydos yra dažniausios įgimtos anomalijos naujagimystėje. Jos yra viena pagrindinių mirties priežasčių pirmaisiais gyvenimo metais. Daugelio įgimtų širdies ydų etiologija yra neaiški. Pastarųjų metų mokslo tyrimai buvo nukreipti širdies vystymosi molekuliniais mechanizmomis išaiškinti. Naujos žinios apie širdies morfologiniuose procesuose dalyvaujančius genus nulėmė įgimtų širdies ydų genetinių priežasčių nustatymą. Straipsnyje apžvelgiami IŠY lemiantys genetiniai veiksniai, nuo didelių genomo persitvarkymų iki vieno nukleotido polimorfizmo, ir aprašomi nauji genetiniai metodai, leidžiantys nustatyti genetines priežastis ir suteikiantys naują sampratą apie įgimtų širdies ydų molekulinę etiologiją.

Įvadas

Įgimtos širdies ydos (IŠY) yra dažniausios įgimtos anomalijos naujagimystėje. Kasmet pasaulyje gimsta 1,35 milijono naujagimių su IŠY (1). Ši liga nustatoma 1 iš 100 naujagimių ir yra viena pagrindinių mirties priežasčių naujagimystėje (2). Nors per pastarąjį dešimtmetį medicinos mokslas ir kardiologija padarė didžiulę pažangą, daugelio IŠY etiologija vis dar lieka neaiški.

IŠY etiologijos nustatymas svarbus pacientui su IŠY ir jo šeimai ne tik psichosocialiniu aspektu, kai sužinojus IŠY diagnozę keliama dažniausi klausimai „kodėl“ ir „kaip“, bet ir šeimos planavimo prasme tiek paciento tėvams, tiek ir sergančiam vaikui, kuomet jis pasieks reproduktyvų amžių. Sėkmingo chirurginio gydymo ir pagerėjusio išgyvenamumo dėka, daugelis pacientų su IŠY pasiekia pilnametystę ir reproduktyvų amžių, todėl didėja suaugusių asmenų su IŠY

populiacija, ir informacija apie ligos etiologiją ir pasikartojimo riziką tampa itin aktuali.

Didžioji dalis IŠY yra daugiaveiksnės etiologijos kompleksinės ligos, kai ligos vystymąsi lemia tiek genetiniai, tiek nepalankūs aplinkos veiksniai. Žmogaus genomo sekoskaita ir molekulinė technologijų pažanga įrodė, kad genetiniai veiksniai IŠY patogenezėje yra reikšmingesni nei aplinkos veiksniai (3). Pastarieji du dešimtmečiai suteikė naują sampratą apie širdies vystymosi reguliavimo molekulinis kelius. Genų paieškos technologijų plėtojimas įgalino atsiradimą daugelio pelių modelių, atkartojančių širdies vystymosi defektus. Šių studijų metu buvo nustatyti transkripcijos reguliaciniai elementai, signalinės molekulės ir struktūriniai genai, kurie yra svarbūs normaliai širdies morfogenezei. Be to, buvo nustatyta daugybė genų, kurie yra kontroliuojami šių konservatyvių molekulinėlių kelių. Šie širdies vystymosi molekulinėlių mechanizmų tyrimai padėjo nustatyti IŠY genetinę etiologiją ir įrodė, kad daugelis genų gali turėti etiologinį vaidmenį žmogaus IŠY.

Tyrimo tikslas – remiantis mokslinės literatūros duomenimis, atskleisti genetines IŠY priežastis ir supažindinti su naujausiais genetinėmis tyrimais IŠY etiologijoje.

Tyrimo objektas ir metodai

Ruošiant straipsnį buvo analizuotos PubMed, ScienceDirect ir BioMedCentral mokslinių straipsnių duomenų bazės. Panaudojus *congenital heart disease, high-resolution array analysis, copy number variation, single nucleotide polymorphism* raktažodžius ar jų kombinacijas, buvo atrinkti ir analizuoti moksliniai straipsniai, kuriuose pateikiama informacija apie genetinę IŠY etiologiją, naujus molekulinis genetinius tyrimo metodus ir jų pritaikymą IŠY diagnostikoje bei numatant chirurginio IŠY gydymo strategiją. Atlikus mokslinių straipsnių analizę, informacija susisteminta ir pateikta straipsnyje.

Genetiniai mechanizmai, lemiantys įgimtas širdies ydas. Įgimtos širdies ydos genetiškai yra labai heteroge-

niška ligų grupė. Širdies ydos gali pasireikšti kaip sudėtinė daugiųjų vystymosi defektų dalis arba būti vienu iš sindromo požymių, tačiau jos dažniausiai pasireiškia kaip izoliuoti defektai ir vadinamos „nesindrominėmis“ IŠY. Didžiąjai daliai pacientų, turinčių IŠY, patologiją lemia *de novo* mutacija. Tokių pacientų genealogijose nėra IŠY atvejų, ir jie vertinami kaip „sporadiniai“ atvejai. Tačiau epidemiologinės studijos parodė, kad netgi šiais tariamai sporadiniais IŠY atvejais yra padidėjusi pasikartojimo rizika širdies patologijai, kurią lemia genetiniai veiksniai, kito nėštumo atveju (4).

Apie 3-5% IŠY gali būti priskiriama mendeliniam sindromams, kai taškinė geno mutacija lemia patologiją, paveldimą pagal mendelinį paveldėjimo modelį (5). Tokios šeiminių IŠY mutacijos paveldimos autosominiu dominantiniu (AD), autosominiu recesyviniu (AR) ar su X chromosoma susijusiu būdu ir pasižymi dideliu penetrantiškumu ir įvairiu klinikiniu pasireiškimu. Kita vertus, tokios mutacijos skirtinguose genuose gali nulemti identišką fenotipinį pasireiškimą, ir tai savo ruožtu parodo labai glaudų funkcijų ryšį tarp širdies vystymesi dalyvaujančių molekulių.

Šimtai autosominių dominantinių ar su X chromosoma susijusių mutacijų buvo nustatytos šeimose su IŠY. Didelėse genealogijose, kuriose per kelias kartas IŠY paveldėtos AD ar su X chromosoma susijusiu būdu, dažniausiai buvo stebimos neletalios IŠY, tokios kaip prieširdžių pertvaros defektas, arba „išgyvenamos“ IŠY su įvairiais fenotipais. Pavyzdžiu galėtų būti AD būdu paveldima kairiosios širdies obstrukcinė liga, fenotipine išraiška varijuojanti nuo dviburio aortos vožtuvo iki hipoplastinės kairės širdies, kurią lemia defektyvus Notch signalinis kelias, ir su X chromosoma susijusi heterotaksija dėl *ZIC3* transkripcijos faktoriaus mutacijos (6). Autosominės recesyvinės mutacijos pasireiškia per kitus alternatyvius genetinius mechanizmus, paaiškinančius populiacinį IŠY paplitimą. Palyginus su dominantinėmis genų mutacijomis, apie šiuos genetinius mechanizmus žinoma mažiau. Autosominis recesyvinis IŠY paveldėjimas patvirtintas genetiškai uždaroje populiacijoje, kuriose dažnos giminingos santuokos. Epidemiologiniai duomenys, kur tėvų giminytė reikšmingai padidina IŠY riziką, įtakingamai įrodo, kad recesyvinės mutacijos lemia IŠY.

Chromosomų persitvarkymai, lemiantys IŠY. Apie 8-13% IŠY atsiranda dėl chromosomų persitvarkymų (7). Dažniausi IŠY nulemiantys chromosominiai persitvarkymai yra chromosomų aneuploidijos (chromosomų skaičiaus pakitimai) ir chromosomų struktūros persitvarkymai (delecijos, duplikacijos), kurie pakeičia chromosominės medžiagos kiekį ir nulemia patologiją dėl dozei jautrių genų efekto. Pavyzdžiui, *TBX1* geno haplonepakankamu-

mas lemia daugelį velokardiofacialinio sindromo (VCFS) klinikinių požymių, taip pat ir širdies patologiją (8). Kiti chromosomų persitvarkymai - reciprokinės translokacijos, insercijos - gali nutraukti genus chromosomų trūkio vietose arba pakeisti geno ir jo reguliacinių elementų sąveiką.

Down (Dauno) sindromas yra viena dažniausių chromosominių patologijų, nustatomų pacientams su IŠY (1 lentelė). Apie 40-50% pacientų su *Down* sindromu turi įgimtas širdies ydas, varijuojančias nuo prieširdžių ir skilvelių pertvaros defektų iki atrioventrikulinės komunikacijos (9). Apie 80% pacientų su VCFS turi širdies ydas, tarp kurių dažniausi yra išstūmimo trakto ir stambiųjų kraujagyslių pažeidimai. Širdies yda nustatoma beveik visais *Patau* sindromo ir *Edwards* sindromo atvejais (10), tačiau dėl didelio mirtingumo pacientų su šiais sindromais ir IŠY yra mažiau, todėl šių sindromų dažnumas yra mažesnis nei Dauno sindromo ir VCFS. Širdies ydas turi 20-50% pacienčių su *Turner* sindromu (11).

Pagrindinis chromosominių ligų diagnozavimo būdas yra kariotipo analizė, kuomet analizuojamos G dažymo būdu išsiruožavusios chromosomos. Tačiau ribota metodo skiriamoji geba limituoja mažesnių nei 5-10 Mb dydžio chromosominių persitvarkymų nustatymą. Žymiai jautresnis yra kitas citogenetikos metodas - fluorescencinė *in situ* hibridizacija (FISH), paremtas specifinių DNR žymenų hibridizacija su metafazinėmis chromosomomis ar interfaziniais branduoliais. FISH leidžia nustatyti ~150-200 Kb specifines mikrodelecijas, mikroduplikacijas ir subtelomeres nesubalansuotas translokacijas. FISH metodas plačiai taikomas mikrodelecinių sindromų nustatymui. Pacientams su IŠY dažniausiai nustatomas *DiGeorge* arba velokardiofacialinis sindromas, dar vadinamas 22q11 delecijos sindromu. Maždaug 3 Mb dydžio mikrodelecija 22q11 srityje lemia dismorfinius veido bruožus, IŠY, pažintinių funkcijų sutrikimą, užkrūčio ir prieskydinių liaukų hipoplaziją/aplaziją, hipokalcemiją. 15% Fallot tetrados (TF) atvejų nustatoma 22q11 mikrodelecija (12). Genų kandidatų sekoskaita (13) ir gyvūnų modeliai (14) parodė, kad iš 30 genų, kuriuos apima 22q11 mikrodelecija, keičiasi tik vieno geno, *TBX1*, lemiančio daugiausia klinikinių požymių, dozė. *TBX1* genas koduoja T-bokso transkripcijos veiksni, inicijuojantį ląstelių proliferaciją antriniame širdies formavime (15,16), iš kurio vystosi išstūmimo traktas ir dešinysis skilvelis (17). Kitas sindromas, susijęs su IŠY, yra *Williams* sindromas, kurį lemia 7q11.23 srityje lokalizuota 1,5 Mb mikrodelecija, keičianti daugiau kaip 25 genų dozę. Supravožtuvinę aortos stenozę ir plaučių arterijos stenozę *Williams* sindromo atveju ir taip pat izoliuotais supravožtuvinės aortos stenozės atvejais lemia pažeistas elastino genas (*ELN*). Kiti klinikiniai šio sindromo požymiai yra „elfo“

1 lentelė. Chromosominiai sindromai, susiję su IŠY

Sindromas/ chromosominė liga	Chromosomos ar jos srities anomalija	Dažniausios IŠY	Dalis pacientų su IŠY
Autosomų ir lytinių chromosomų aneuploidijos			
8 chromosomos trisomijos mozaicizmas	8 chromosomos trisomijos mozaicizmas	SPD, AAL, AoKo, PS, PAPVĮ, BAK	25%
9 chromosomos trisomija	9 chromosomos trisomija	AAL, SPD, TF, DIDS	65-80%
Patau	13 chromosomos trisomija	PPD, SPD, AAL, DIDS, TF, AoKo, HKŠS, SKT, AVK, PAPVĮ, dekstrokardija	80%-100%
Edwards	18 chromosomos trisomija	PPD, SPD, TF, AoKo, DIDS, HKŠS	90%-100%
Down	21 chromosomos trisomija	AVK, PPD, SPD, TF	40%-50%
Turner	X chromosomos monosomija	AoKo, AS, HKŠS, DAPVĮ	20%-50%
Klainerfelter	Priedinė X chromosoma	PPD, AAL, MVP	50%
Mikrodeleciniai sindromai			
Wolf-Hirschhorn	4p delecija	AA, AAL, PPD, SPD,	50-65%
DiGeorge	22q11.2delecija	TF, PAL, BAK, SPD, aortos lanko anomalijos	75%-85%
Williams	7q11.23delecija	SVAS, PVS, PS, PPS	50%-80%
Sindromai, susiję su chromosomų struktūros anomalijomis			
8p delecijos sindromas	8p delecija	AVK, PS, SPD, TF	50-75%
10p delecijos sindromas	10p delecija	SPD, PPD, AAL, PS, AoKo, BAK	50%
Cat Eye	22q11 tetrasomija	PAPVĮ, DAPVĮ, TF	>50%
Pallister-Killian	12ptetrasomija	SPD, AoKo, AAL, PPD, AS	25%
Cri-du-Chat	5p15.2 delecija	SPD, AAL, PPD, TF	10%-55%
Jakobsen	11q23 delecija	HLHS, KSITS	>50%
1p36 delecijos sindromas	1p36 delecija	AAL, nekompaktinio miokardo kardiomiopatija	?

AA – aortos atrezija, AAL – atviras arterinis latakas, AoKo – aortos koarktacija, AVK – atrioventrikulinė komunikacija, AS – aortos stenozė, DAPVĮ – dalinis anomalus plaučių venų įtekėjimas, DIDS – dvigubas ištekėjimas iš dešinio skilvelio, HK – hipertrofinė kardiomiopatija, HKŠS – hipoplastinės kairiosios širdies sindromas, TF – Fallot tetrada, KSITS – kairiojo skilvelio išvairymo trakto stenozė, MVP – mitralinio vožtuvo prolapsas, PAL – pertrauktas aortos lankas, PPD – prieširdžių pertvaros defektas, PPS – periferinė plaučių stenozė, PS – plaučių stenozė, PVS – plaučių vožtuvo stenozė, SKT – stambiųjų kraujagyslių transpozicija, SVAS – supravožuvinė aortos stenozė, SPD – skilvelių pertvaros defektas, BAK – bendras arterinis kamienas, PAPVĮ – plaučių venų įtekėjimas

veidas, raidos atsilikimas, hiperkalcemija, savitai išreikštas draugiškumas (18). Nepaisant FISH metodo efektyvumo, ši technologija naudojama tik žinomoms chromosomų sritims tirti ir negali būti pritaikoma plataus masto genomo tyrimuose identifikuojant naujus genomo persitvarkymus (1 lentelė).

Sindrominės IŠY ir taškinės geno mutacijos. Genetinių technologijų pažanga ir įgyvendintas Žmogaus genomo projektas leido išaiškinti pavienių genų mutacijas, lemiančias su IŠY susijusius sindromus (2 lentelė). Taškinės mutacijos padidina arba sumažina dozę genų, dalyvaujančių svarbiuose organogenezės mechanizmuose. Nustatyta, kad mutacijos fibrilino1 (*FBNI*) gene lemia *Marfan* sindromą, paveldimą autosominiu dominantiniu būdu, kuris pasireiš-

kia progresuojančiu aortos šaknies išsiplėtimu, skeleto ir akių patologija (19). Genetinės etiologijos nustatymui buvo naudoti tradiciniai pozicinio klonavimo metodai ir analizuotos didelės genealogijos su sergančiais nariais, turinčiais unikalius fenotipus. Nuo tada buvo nustatytos daugelio sindromų genetinės priežastys, ir kiekvienas sindromas apibūdintas pagal unikalią požymių visumą. *Alagille* sindromą lemia Notch signalinio kelio (evoliuciškai konservatyvus tarpląstelinis signalinis mechanizmas, būtinas normaliam embriono vystymuisi) transmembraninio receptoriaus *NOTCH2* ir ligando *JAG1* (90% atvejų) genų dominantinės mutacijos. *Alagille* sindromui būdingi klinikiniai požymiai yra skeleto anomalijos, savita veido išraiška, plaučių arterijos stenozė, Fallot tetrada, kitos IŠY, akių patologija, cholestazė (20). *Holt-Oram* sindromas pasižymi viršutinių galūnių anomalijomis, prieširdžių pertvaros defektu, skilvelių pertvaros defektu, laidumo sistemos sutrikimais. Sindromą lemia *TBX5* geno, kuris koduoja transkripcijos veiksnį, turinčius konservatyvią DNR seką, dominantinės funkcijos praradimo mutacijos. *TBX5* geno raiška vyksta rankų srityje ir širdyje. Nustatyta, kad mutacijos suardo 5^o-reguliacines sekas ir mažina *TBX5* baltymo funkcinį lygį (21). *Noonan* sindromo klinikiniai požymiai yra tipiški veido bruožai, pažintinių funkcijų sutrikimas, širdies ydos, dažniausiai plaučių arterijos vožtuvo stenozė ir hipertrofinė kardiomiopatija, krešėjimo sutrikimai.

Sindromą lemia dominantinė mutacija viename iš 11-os genų: *SOS1*, *RAF1*, *KRAS*, *BRAF*, *MEK1*, *MEK2*, *HRAS*, *NRAS*, *SHOC2* ir *CBL*. Mutacija *PTPN11* gene, kurio molekulės dalyvauja Ras signaliniame kelyje, lemia 50% sindromo atvejų. Ras kelias svarbus ląstelių proliferacijoje, diferenciacijoje, ir lieka aktyvus po transkripcijos aktyvavimo reguliavimo ir chromatino modifikavimo. *LEOPARD* ir *Costello* sindromai, kurių fenotipinė išraiška panaši į *Noonan* sindromo, apspręsti Ras signaliniame kelyje dalyvaujančių molekulių mutacijų (2 lentelė).

Nesindrominės IŠY ir taškinės geno mutacijos. Pastaruoju metu IŠY tyrimuose pagrindinis dėmesys skiriamas genų, susijusių su nesindrominėmis, šeiminėmis IŠY formomis, identifikavimui. Dažniausias šioje grupėje yra

autosominis dominantinis paveldėjimas, tačiau daugeliu atvejų lieka neaiškus mutacijų patogeniškumas ir jų vaidmuo ligos fenotipui ir segregacijai. Nors didžioji dalis iki šiol nustatytų genų koduoja transkripcijos veiksnius (baltymus, reguliuojančius genų raišką), nustatyti genai, kurie koduoja struktūrinius širdies audinio baltymus - aktiną ir mioziną. Pirmieji genai, kurie buvo susieti su nesindrominėmis ĮŠY, buvo *NKX2-5* ir *GATA4* genai (22). Šiuo metu jau nustatyta apie 40 genų (3 lentelė). Autosominės mutacijos genuose, manoma, susilpnina fiziologinį koduojamo baltymo lygį per keletą mechanizmų: vieno alelio inaktivavimą, arba funkcijos praradimą suardant DNR sąveikas, arba transkripcijos veiksnų ir kofaktorių kombinatorinių sąveikų sutrikdymą. Nustačius funkcijos praradimo mutacijas negimininguose ĮŠY atvejuose ir pelių modeliuose su heterozigotinėmis genų delecijomis, dėl kurių pasikartojo pas pacientus nustatyta širdies patologija, buvo galutinai įrodyta, kad širdies transkripcijos faktorių haplonepakankumas lemia ĮŠY.

Širdies transkripcijos veiksnų raiška vyksta labai specifikuose „laikinos erdvės“ keliuose per visą organogenezę – tai tam tikras reguliacijos lygis, dėl kurio turėtų stipriai koreliuoti ĮŠY genotipas su fenotipu. Tačiau priešingai šiai prielaidai klinikinis spektras anomalijų, kurios atsiranda dėl mutacijų širdies transkripcijos veiksnų genuose, yra labai platus. Antra vertus, kai kurios ĮŠY mutacijos pasireiškia specifiniu klinikiu fenotipu. Funkcijos praradimo mutacijos *GATA4* gene dažniausia lemia prieširdžių pertvaros defektus, taip pat dėl šių mutacijų suardomos *GATA4-SMAD4* sąveikos, kurios yra svarbios prieširdžių

2 lentelė. Vieno geno mutacijos sindromai, susiję su ĮŠY.

Sindromas	Genas	Dažniausios ĮŠY	Dalis pacientų su ĮŠY
Alagille	<i>JAG1, NOTCH1</i>	PPS, PS, PPD, TF	85%-95%
Holt-Oram	<i>TBX5</i>	PPD, SPD, AVK, TF, AAL	85%
Noonan	<i>PTPN11, KRAS, SOS1, RAF, BRAF, MEK1, HRAS, NRAS, SHOC2, CBL, NF1</i>	PS, PPD, SPD, AAL	80%
Char	<i>TFAP2B</i>	AAL	60%
Ellis-van Creveld	<i>EVC, EVC2</i>	PPD, vienas prieširdis, AVK	60%
Smith-Lemli-Opitz	<i>DHCR7</i>	AVK, PPD, SPD, DAPVI	45%
CHARGE	<i>CHD7, SEMA3E</i>	PPD, SPD, TF, vožtuvo defektai	50%-80%
Kabuki	<i>MLL2</i>	PPD, SPD, TF, vienas skilvelis, AoKo, AAL, SKT	31%-55%
Costello	<i>HRAS</i>	PS, kitos struktūrinės širdies ydos, hipertrofija, ritmo sutrikimai	63%
Marfan	<i>FBNI, TGFBR1, TGFBR2</i>	Aortos disekacija, MVP	?

AAL - atviras arterinis latakas, *AoKo* - aortos koarktacija, *AVK* - atrioventrikulinė komunikacija, *DAPVI* - dalinis anomalus plaučių venų įtekėjimas, *MVP* - mitralinio vožtuvo prolapsas, *TF* - Fallot tetrada, *PPD* - prieširdžių pertvaros defektas, *PPS* - periferinė plaučių stenozė, *PS* - plaučių stenozė, *SKT* - stambiųjų kraujagyslių transpozicija, *SPD* - skilvelių pertvaros defektas

vystymuisi, todėl kai kuriems pacientams formuojasi atrioventrikulinio kanalo defektai (23).

ĮŠY lemia funkcijos praradimo mutacijos įvairiuose genuose, kurie koduoja vystymosi signaliniuose keliuose dalyvaujančias molekules. Embriogenezės metu vyksta kairės-dešinės ašies nustatymas lateraliu signaliniu keliu, kuris nulemia asimetrinį organų, tame tarpe ir širdies kilpos, išsidėstymą centrinės ašies atžvilgiu. Mutacijos *ZIC3*, *NODAL* ir *LEFTY2* genuose, atsakinguose už normalų širdies kilpos formavimąsi, suardo normalius lateralius signalus ir lemia spektrą širdies defektų. Daugelyje širdies vystymosi mechanizmų dalyvauja NOTCH signalinis kelias. Mutacijos *NOTCH1*, *NOTCH2* ir *JAG1* genuose silpnina ligando indukuotą signalo perdavimą, ir lemia skirtingas fenotipines išraiškas (3 lentelė).

Kopijų skaičiaus pakitimai ir įgimtos širdies ydos. Nepaisant medicinos mokslo pažangos ir naujų technologijų atradimų, didelė dalis asmenų su ĮŠY neturi pavienių genų defektų. Žmogaus genomo sekoskaita atskleidė naujas žinias apie genetinę įvairovę. Vienas iš genetinių variantų yra kopijų skaičiaus pakitimai (*ang.* copy number variation, CNV). Kopijų skaičiaus pakitimai (KSP) – tai didelių DNR segmentų (>1Kb) kopijų skaičiaus pakitimai, t.y. duplikacijos ir delecijos, susidariusios dėl nealelinės homologinės rekombinacijos. KSP keičia genų dozę ir pažeidžia apie 12-15% žmogaus genomo (24,31). KSP laikomi polimorfizmais, kai pasireiškia daugiau nei 1% populiacijos, ir laikomi susiję su liga, kuomet atsiranda mažiau nei 1% individų. Lyginamoji genomo hibridizacija (LGH) yra DNR mikrolustų pagrindu sukurtas metodas, kuris įgalina nustatyti šiuos submikroskopinius KSP per visą genomą. LGH yra molekulinis citogenetinis metodas, skirtas identifikuoti KSP tiriamajame genome lyginant su referentiniu genomu. Atliktos studijos parodė, kad KSP randami skirtingose genomo vietose ir yra glaudžiai susiję su autizmu, šizofrenija ir raidos atsilikimu, taip pat nustatyti asmenims, turintiems daugines vystymosi ydas. Lyginamoji genomo hibridizacija šiuo metu plačiai naudojama tirti intelektinei negaliai, kuri gali pasireikšti ir su dismorfinais požymiais.

Unikalūs KSP yra susiję ir su įgimtomis širdies ydomis. KSP tyrimai, naudojant LGH metodą, ĮŠY diagnostikoje pirmiausia buvo pradėti taikyti tiriant sindromines ĮŠY. Iki

šiول aprašyta tik keletas studijų, kuriose naudojant LGH metodą, buvo tirti vaikai, turintys sindromines ĮŠY, ir 17% - 21% atvejų nustatyti unikalūs KSP.

Vienose iš pirmųjų studijų atlikus genomo analizę LGH metodu asmenims su ĮŠY ir kitomis dauginėmis vystymosi ydomis, vienu atveju buvo nustatyta 2,3 Mb dydžio mikrodelecija, lokalizuota 8 chromosomos p21 regione. Vėlesni kritinio regiono sekoskaitos tyrimai atskleidė heterozigotinę mutaciją *CHD7* gene, koduojančiame chromodomeno helikazės DNR-surišimo baltymą, kurio raiška vyksta embriogenezės metu, ir iškėlė prielaidą, kad *CHD7* geno haplonepakankamumas lemia CHARGE sindromą (25). Tolesnių studijų metu patogeninės mutacijos buvo nustatytos per 50% atvejų iš 110 tirtų pacientų su CHARGE sindromu (26).

Thienpont su kolegomis atliko genomo analizę 1-Mb skiriamosios gebos LGH metodu 60 pacientų su ĮŠY, kitais raidos defektais ir normaliu kariotipu, ir nustatė retus KSP 30% tirtųjų. Nors kai kurie KSP buvo rasti kritinėse širdies vystymuisi *NKX2-5* ir *NOTCH1* genų srityse, didžioji dalis KSP nebuvo lokalizuoti „širdies“ genuose. Klinikinė KSP reikšmė buvo patvirtinama tuomet, kai KSP buvo lokalizuotas genuose, svarbiuose širdies vystymuisi, arba kai jie atsirado *de novo*, ir analizė atskleidė, kad atliktose studijose 17% pacientų turi kliniškai reikšmingus KSP. Likusieji 13% pacientų KSP buvo paveldėję iš sveikų tėvų, todėl šiuos KSP negalima laikyti ligos priežastimi. Šios studijos parodė, kad KSP yra susiję su ĮŠY, kurios pasireiškia kartu su kitomis įgimtomis ydomis ar raidos atsilikimu (27). Breckpot su kolegomis apjungė Thienpont ir kolegų atliktus 60 pacientų tyrimus atlikdami genomo analizę 1-Mb skiriamosios gebos LGH metodu 150 pacientų su neišaiškios priežasties sindrominėmis ĮŠY, ir nustatė 17,3% retų kliniškai reikšmingų KSP. Kopijų skaičiaus variantai, kurie anksčiau nebuvo aprašyti sveikų asmenų populiacijoje, buvo laikomi ligos priežastimi, kai delecija ar duplikacija: 1) buvo lokalizuota žinomos ligos, susijusios su chromosomų nesubalansuotumu, srityje arba 2) apėmė genus, lemiančius ĮŠY, kai įvykusi juose mutacija. Šie KSP pilnai ar dalinai paaiškino pacientų fenotipų pasireiškimą (28).

Richards su kolegomis panaudodami aukštos skiriamosios gebos viso genomo LGH nustatė retus KSP 20 individų, turinčių ĮŠY, kitas įgimtas raidos anomalijas ir normalų kariotipą, imtyje. Šiuose tyrimuose 20 pacientų su izoliuota ĮŠY be kitų įgimtų raidos anomalijų imtis buvo panaudota kaip kontro-

3 lentelė. Genai, susiję su nesindrominėmis ĮŠY

Baltymų grupė	Genai	Genomo lokusas	Dažniausios ĮŠY
Struktūriniai baltymai	<i>ACTC</i> <i>ELN</i> <i>MYH11</i> <i>MYH6</i> <i>MYH7</i>	7q11.23 16p13.11 14q12 14q12	PPD SVAS, PS, AS AAL, aortos aneurizma PPD, BAK, AS, SKT Ebsteino anomalija, PPD
Transkripcijos veiksniai ir kofaktoriai	<i>ANKRD1</i> <i>CITED2</i> <i>ZFPM2</i> <i>GATA4</i> <i>GATA6</i> <i>HAND1</i> <i>HAND2</i> <i>IRX4</i> <i>MED13L</i> <i>NKX2-5</i> <i>NKX2-6</i> <i>TBX1</i> <i>TBX5</i> <i>TBX20</i> <i>TFAP2B</i> <i>ZIC3</i>	10q23.31 6q23.3 8q23 8p23.1 18q11.1-18q11.2 5q33 4q33 5p15.3 12q24.21 5q34 8p21.2 22q11.21 12q24.1 7p14.3 6p12 Xq26.2	PAPVĮ SPD, PPD TF, DIDS PPD, PS, SPD, TF, AVK, DAPVĮ PPD, TF, PS, AVK, AAL, SPD HKŠS TF SPD SKT SPD, PPD, TF, HKŠS, AoKo, SKT, DIDS, PAL BAK TF AVK, PPD, SPD PPD, SPD AAL SKT, PS, DIDS, PAPVĮ, PPD, HKŠS, SPD, destrukardija, kairės-dešinės ašies defektai
Receptoriai, ligandai ir signalinės molekulės	<i>ACVR1/ALK2</i> <i>ACVR2B</i> <i>ALDH1A2</i> <i>CFC1/</i> <i>CRYPTIC</i> <i>CRELD1</i> <i>FOXH1</i> <i>GDF1</i> <i>GJA1</i> <i>JAG1</i> <i>LEFTY2</i> <i>NODAL</i> <i>NOTCH1</i> <i>PDGFRA</i> <i>SMAD6</i> <i>TAB2</i> <i>TDGF1</i> <i>VEGF</i>	2q23-q24 3p22 15q21.3 2q21.1 3p25.3 8q24.3 19p12 6q22.31 20p12.1-p11.23 1q42.1 10q22.1 9q34.3 4q12 15q21-q22 6q25.1 3p21.31 6p12	AVK PS, DIDS, SKT, destrukardija TF TF, SKT, AVK, PPD, SPD, PAL, DIDS PPD, AVK TF, SKT Heterotaksija, TF, SKT, DIDS PPD, HKŠS, PAPVĮ, TF SKT, AVK, PAL, AoKo, kairės-dešinės ašies defektai, SKT, TF, DIDS, destrukardija, PAPVĮ, AVK AS, AoKo, HKŠS PAPVĮ AoKo, AS TF, SPD AoKo

AAL - atviras arterinis latakas, *AoKo* - aortos koarktacija, *AVK* - atrioventrikulinė komunikacija, *AS* - aortos stenozė, *DAPVĮ* - dalinis anomalus plaučių venų įtekėjimas, *DIDS* - dvigubas ištekėjimas iš dešinio skilvelio, *HKŠS* - hipoplastinės kairiosios širdies sindromas, *TF* - Fallot tetrada, *PAL* - pertrauktas aortos lankas, *PPD* - prieširdžių pertvaros defektas, *PPS* - periferinė plaučių stenozė, *PS* - plaučių stenozė, *SKT* - stambųjų kraujagyslių transpozicija, *SVAS* - supravoztuvinė aortos stenozė, *SPD* - skilvelių pertvaros defektas, *BAK* - bendras arterinis kamienas, *PAPVĮ* - plaučių venų įtekėjimas

linė grupė. Dideli kliniškai reikšmingi KSP buvo nustatyti penkiems pacientams, turintiems ĮŠY ir neurologinius sutrikimus ar raidos atsilikimą. Kontrolinėje grupėje KSP nebuvo nustatyta. Gauti rezultatai parodė, kad viso genomo LGH panaudojimas nustatyti su liga susijusius KSP individams su ĮŠY ir neurologiniais sutrikimais gali būti efektyvus, ypač jeigu tokiam asmeniui nusta-

tytas normalus kariotipas (29).

Dar vienoje studijoje 12 (20,7%) potencialiai patogeninių KSP buvo nustatyti 58 pacientų, turinčių ĮŠY kartu su kitais įgimtais raidos defektais, imtyje. KSP dydis varijavo nuo 240 Kb iki 9,6 Mb. Rasti KSP apėmė *NRPI*, *NTRK3*, *MESPI*, *ADAMI9* ir *HAND1* genus, dalyvaujančius širdies vystymesi (30).

Ypatingą susidomėjimą genetinių variantų tyrimai kelia izoliuotų ĮŠY grupėje. Neseniai aprašytos studijos parodė, kad 1q21.1 regiono mikroduplikacijos lemia apie 1% TF rizikos, ir kad *GJA5* geno duplikacija padidina TF riziką 10 kartų (31).

Erdogan su kolegomis atliko viso genomo analizę 1-Mb skiriamosios gebos LGH metodu 105 individams su įvairiomis izoliuotomis ĮŠY be kitų įgimtų anomalijų ar raidos atsilikimo. Buvo nustatyta 18 naujų KSP, tarp kurių viena delecija ir dvi duplikacijos atsiradusios *de novo*. Be to, 44% atvejai buvo šeiminiai, kai KSP buvo nustatyti tėvams, neturintiems ĮŠY. Tai galbūt parodo, kad šie KSP padidina polinkį į ĮŠY, tačiau fenotipo pasireiškimui reikalingi ir kiti modifikuojantys veiksniai. Tai leidžia manyti, kad reti KSP gali būti svarbūs genetiniai veiksniai ĮŠY patogenezėje (32). Kitose studijose Greenway su kolegomis išskėlė hipotezę, kad *de novo* mutacijos, keičiančios širdies vystymesi dalyvaujančių genų dozę, gali lemti izoliuotą TF. Individams su izoliuota, sporadine TF buvo atlikta viso genomo analizė ir nustatyta 11 retų *de novo* KSP 114 triadų. Vienu TF atveju KSP rasti šešiose srityse, kurių dvi koduoja žinomus ligos genus *NOTCH1* ir *JAG1*. Šie tyrimai parodė, kad mažiausiai 10% izoliuotų, sporadinių TF lemia *de novo* chromosomų nesubalansuotumas. Trijose TF triadose KSP buvo nustatyti 1q21.2, 3p25.1 ir 7p21.3 srityse, kurios buvo paveldėtos iš sveikų tėvų, taigi šie radiniai patvirtina papildomų genetinių ar aplinkos sąveikų vaidmenį TF atsiradimui (33). Šios abi studijos (32, 33) parodė įvairovę potencialių, su liga susijusių chromosominių pokyčių, kurie ateityje gali apibūdinti naujus delecijų ar duplikacijų sindromus. Nustatymas panašių ar dalinai persidengiančių KSP ir/ar nustatymas su liga susijusių mutacijų genuose, esančiuose tose pačiose srityse, ateityje išaiškins jų vaidmenį klinikiniuose fenotipuose, įskaitant širdies ligas ir kitas įgimtas ydas.

Vieno nukleotido polimorfizmai ir įgimtos širdies ydos. Kitas genetinės įvairovės tipas yra vieno nukleotido polimorfizmai (*ang.* single nukleotide polymorphisms, SNPs). Vieno nukleotido polimorfizmai (VNP) - tai pavienių bazių porų pokyčiai, randami per visą genomą. Manoma, kad VNP yra labiausiai paplitę genetiniai variantai žmogaus genome. Žmogaus genomo projektas parodė, kad 90% žmogaus genetinių pokyčių lemia VNP (34). VNP gali

atsirasti koduojančiose ar nekoduojančiose genomo srityse, ir kiekvienas VNP nebūtinai veikia geno funkciją. Kai kurie VNP modifikuoja atsaką į medikamentus, kiti susiję su polinkiu ligai. Viso genomo asociacijos studijos nustatė VNP, kurie padidina polinkį tokioms paplitusioms ligoms kaip vėžys, diabetas, koronarinė širdies liga. Papildomos studijos patvirtino šias asociacijas didelėse tiriamųjų imtyse. Taip pat buvo nustatyti VNP, kurie veikia ĮŠY vystymąsi, nors ši sritis dar tik pradama tyrinėti. ĮŠY tyrimuose VNP asociacijos studijos nukreipiamos į polimorfizmų kandidatiniuose genuose, kurie dalyvauja ĮŠY patogenezėje, nustatymą.

Pastarąjį dešimtmetį keletas klinikinių tyrimų parodė, kad folinės rūgšties vartojimas prieš pastojant apsaugo nuo ĮŠY atsiradimo. Folatų stoka tiek nėščios moters organizme, tiek besivystančiame embrione gali lemti ĮŠY vystymąsi. Todėl esminiai genai, dalyvaujantys folatų metabolizme, tirti kaip genai kandidatai, padidinantys ĮŠY riziką. ĮŠY gali būti susijusi su paplitusiais folatų metabolizmo polimorfiniiais genų variantais, tokiais kaip metilentetrahidrafolato reduktazės geno *MTHFR* c.677C>T ir c.1298A>C, nors šie rezultatai yra priešaringi (35).

Žinoma, kad padidėjusi homocisteino koncentracija yra rizikos faktorius ĮŠY. Ankstyvose embriono vystymosi stadijose homocisteinas pašalinamas išskirtinai per metionino sintazės geno *MTR* aktyvumą. Tyrinėjant *MTR* geno vaidmenį ĮŠY rizikoje, buvo nustatyti *MTR* genetiniai variantai ir ištirti mechanizmai, kurie veikia *MTR* raišką ir didina riziką ĮŠY kinų populiacijoje. Buvo nustatyti du *MTR* geno variantai -186T>G ir 905G>A, kurie susiję su padidinta ĮŠY rizika. Palyginus su pagrindiniu aleliu, -186G alelis pasižymėjo reikšmingai žemesniu promotoriaus aktyvumu, sumažino transkripcijos veiksnio surišimo afiniškumą. Taigi, *MTR* geno reguliatoriniai variantai padidina ĮŠY riziką susilpnindami *MTR* geno raišką ir indukuodami homocisteino kaupimąsi (36).

Kitose studijose buvo parodyta, kad normaliam širdies vystymuisi yra svarbus ISL1 transkripcijos veiksnys. ISL1 transkripcijos veiksnys „žymi“ širdies pirmtako ląsteles ir generuoja skirtingas širdies ląstelių linijas. Dėl svarbaus ISL1 vaidmens širdies morfogeneze jis tapo išskirtiniu genu kandidatu, lemiančiu kompleksines ĮŠY. Buvo tirta 300 pacientų su kompleksinėmis ĮŠY ir nustatyti aštuoni VNP, reikšmingai susiję su kompleksinėmis ĮŠY (37).

Apibendrinimas

Pastarųjų metų molekulinė technologijų pažanga leido suprasti nežinomas genetines ĮŠY priežastis. Iki šiol buvo žinoma, kad genetinius sindromus su ĮŠY lemia chromosomų aneuploidijos, genomines ar vieno geno taškinės mutacijos. Ir tik dabar pradama suprasti kopijų skaičiaus

variantų reikšmė ĮŠY etiologijoje. Novatoriškų viso genomo skenavimo metodų - LGH, viso genomo ir egzomo sekoskaita - taikymas atveria naują puslapį kompleksinių, daugiaveiksnių ĮŠY tyrinėjimams. Jau dabar įrodyta, kad tam tikri kopijų skaičiaus pakitimai yra kliniškai reikšmingi ĮŠY pasireikšti. Naujos genetinės technologijos gali paspartinti genų kandidatų atradimus ir padėti geriau suprasti esminius mechanizmus, reguliuojančius genų ir baltymų dozes. Tai savo ruožtu leistų apibūdinti naujas ĮŠY priežastis ir pagerintų asmenų su ĮŠY ir jų šeimų genetinį konsultavimą ir medicininę priežiūrą.

Literatūra

- Fahed AC, Gelb BD, Seidman JG. et al. Genetics of congenital heart disease: the glass half empty. *Circ Res.* 2013; 112(4): 70720.
- Connor JA, Hinton RB, Miller EM. et al. Genetic testing practices in infants with congenital heart disease. *Congenit Heart Dis.* 2013; 10.1111/chd.12112.
- Øyen N, Poulsen G, Wohlfahrt J. et al. Recurrence of discordant congenital heart defects in families. *Circ Cardiovasc Genet.* 2010; 3(2):122-128.
- Garg V. Insights into the genetic basis of congenital heart disease. *Cell Mol Life Sci.* 2006; 63: 1141-1148.
- van der Bom T, Zomer AC, Zwinderman AH. et al. The changing epidemiology of congenital heart disease. *Nat Rev Cardiol* 2011; 8:50-60.
- Yuan S, Zaidi S, Brueckner M. Congenital heart disease: emerging themes linking genetics and development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2013; 23:352-359.
- Pierpont ME, Basson CT, Benson DW. et al. Genetic basis for congenital heart defects: current knowledge: a scientific statement from the American Heart Association congenital cardiac defects committee, Council on cardiovascular disease in the Young: endorsed by the American Academy of Pediatrics. *Circ.* 2007; 115:3015-3038.
- Merscher S, Funke B, Epstein JA. et al. TBX1 is responsible for cardiovascular defects in velo-cardio-facial/DiGeorge syndrome. *Cell* 2001; 104: 619-629.
- Antonarakis SE, Lyle R, Dermitzakis ET, Reymond A. et al. Chromosome 21 and Down syndrome: from genomics to pathophysiology. *Nat Rev Genet.* 2004; 5:725-738.
- Pont SJ, Robbins JM, Bird TM. et al. Congenital malformations among liveborn infants with trisomies 18 and 13. *Am J Med Genet A.* 2006; 140:1749-1756.
- Bondy CA. Turner syndrome 2008. *Horm Res.* 2009; 71 (Suppl 1):52-56.
- Goldmuntz E. DiGeorge syndrome: new insights. *Clin Perinatol.* 2005; 32:963-978.
- Yagi H, Furutani Y, Hamada H. et al. Role of TBX1 in human del22q11.2 syndrome. *Lancet.* 2003; 362:1366-1373.
- Funato N, Nakamura M, Richardson JA. et al. Tbx1 regulates oral epithelial adhesion and palatal development. *Hum Mol Genet.* 2012; 21:2524-2537.
- Xu H, Morishima M, Wylie JN. Tbx1 has a dual role in the morphogenesis of the cardiac outflow tract. *Development.* 2004; 131:3217-3227.
- Liao J, Aggarwal VS, Nowotschin S. et al. Identification of downstream genetic pathways of Tbx1 in the second heart field. *Dev Biol.* 2008; 316:524-537.
- Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet.* 2005; 6:826-835.
- Pober BR. Williams-Beuren syndrome. *N Engl J Med.* 2010; 362:239-252.
- Dietz HC, Cutting GR, Pyeritz RE. et al. Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature* 1991; 352(6333): 337-9.
- McDaniell R, Warthen DM, Sanchez-Lara, PA. et al. NOTCH2 mutations cause Alagille syndrome, a heterogeneous disorder of the notch signaling pathway. *Am J Hum Genet* 2006; 79(1): 169-73.
- Showell C, Binder O, Conlon FL. T-box genes in early embryogenesis. *Dev Dyn.* 2004; 229:201-218.
- Butler TL, Esposito G, Blue GM. et al. GATA4 mutations in 357 unrelated patients with congenital heart malformation. *Genet Test Mol Biomarkers* 2010; 14: 797-802.
- Moskowitz IP, Wang J, Peterson MA. et al. Transcription factor genes Smad4 and Gata4 cooperatively regulate cardiac valve development. [corrected]. *Pro Ant Acad Sci USA.* 2011; 108:4006-4011.
- Estivill X, Armengol L. Copy number variants and common disorders: filling the gaps and exploring complexity in genome-wide association studies. *PLoS Genet* 2007; 3(10):1787-1799.
- Vissers LE, van Ravenswaaij CM, Admiraal R. et al. Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. *Nat Genet* 2004; 36(9): 955-7.
- Lalani SR, Safiullah AM, Fernbach SD. et al. Spectrum of CHD7 mutations in 110 individuals with CHARGE syndrome and genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet* 2006; 78(2):303-14.
- Thienpont B, Mertens L, de Ravel T. et al. Submicroscopic chromosomal imbalances detected by array-CGH are a frequent cause of congenital heart defects in selected patients. *Eur Heart J* 2007; 28(22): 2778-84.
- Breckpot J, Thienpont B, Peeters H. et al. Array comparative genomic hybridization as a diagnostic tool for syndromic heart defects. *J Pediatr.* 2010; 156:810-7.
- Richards AA, Santos LJ, Nichols HA. et al. Cryptic Chromosomal Abnormalities Identified in Children With Congenital Heart Disease. *Pediatr Res* 2008; 64(4): 358-63.
- Goldmuntz E, Paluru P, Glessner J. et al. Microdeletions and Microduplications in Patients with Congenital Heart Disease

- and Multiple Congenital Anomalies. *Congenit Heart Dis.* 2011; 6:592-602.
31. Soemedi R, Topf A, Wilson IJ. et al. Phenotype-specific effect of chromosome 1q21.1 rearrangements and GJA5 duplications in 2436 congenital heart disease patients and 6760 controls. *Hum Mol Genet* 2012; 21:1513-1520.
 32. Erdogan F, Larsen LA, Zhang L. et al. High frequency of submicroscopic genomic aberrations detected by tiling path array comparative genome hybridisation in patients with isolated congenital heart disease. *J Med Genet.* 2008;45:704–709.
 33. Greenway SC, Pereira AC, Lin JC. et al. De novo copy number variants identify new genes and loci in isolated sporadic tetralogy of Fallot. *Nat Genet.* 2009;41:931–935.
 34. The International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature* 2003; 426: 789-96.
 35. Storti S, Vittorini S, Jasone MR. et al. Association between 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and conotruncal heart defects. *ClinChem Lab Med* 2003;41(3):276-280.
 36. Zhao J.-Y., Qiao B., Duan W.-Y. et al. Genetic variants reducing MTR gene expression increase the risk of congenital heart disease in Han Chinese populations. *Eur Heart J* 2013; doi:10.1093/eurheartj/eh221.
 37. Stevens KN, Hakonarson H, Kim CE. et al. Common variation in ISL1 confers genetic susceptibility for human congenital heart disease. *PLoS One* 2010;5(5) e10855.

CONGENITAL HEART DISEASE: GENETIC ETIOLOGY AND DIAGNOSTICS

B. Aleksūnienė, A. Utkus, V. Tarutis

Key words: congenital heart disease, gene mutation, copy number variation, single nucleotide polymorphisms.

Summary

Congenital heart disease (CHD) is the most common type of birth defect. It is leading cause of death in the first of year of live. The etiology of CHD is still not completely understood. Recent scientific investigations have focused on discovering of molecular mechanisms of cardiac development. New knowledges about genes participating in cardiac morphogenesis have led to the identification of genetic etiologies of CHD. In this article, genetic factors causing CHD, from large genome rearrangements to single nucleotide polymorphisms are reviewed, and new genetic techniques, allowing to reveal the genetic causes and providing new understanding about molecular etiology of CHD are described.

Correspondence to: beata.aleksiuniene@santa.lt

Gauta 2014-03-03