

DIJAGNOSTIČKI PRISTUP DJETETU S DISMORFIJOM I RAZVOJNIM ZAOSTAJANJEM

Ingeborg BARIŠIĆ

Referentni centar Ministarstva
Republike Hrvatske za praćenje
kongenitalnih anomalija,
Klinika za dječje bolesti,
Zagreb, Republika Hrvatska

Adresa za dopisivanje:
Prof. dr. sc. Ingeborg Barišić
Referentni centar Ministarstva
Republike Hrvatske za praćenje
kongenitalnih anomalija
Klinika za dječje bolesti
Klaićeva 16, 10000 Zagreb
e-mail: ingeborg.barisic@kdb.hr

Primljeno: 31. 12. 2007.

Prihvaćeno: 25. 1. 2008.

Pedijatrija danas 2008;4(1):1-11

Mentalna retardacija/razvojno zaostajanje (MR/RZ) je čest klinički problem. Kako je etiologija heterogena, dijagnostika je često složena i skupa, a sve do nedavno uzrok bolesti u više od polovice bolesnika se nije mogao utvrditi. U posljednje je vrijeme razvoj molekularne citogenetike doveo do spoznaje da je veći dio razvojnog zaostajanja uzrokovan submikroskopskim poremećajima genoma. U ovom radu dajemo prijedlog postupnika obrade osoba s MR/RZ, dismorfijom i/ili malformacijama te prikaz odgovarajućih kliničkih i laboratorijskih ispitivanja, uključujući i opis novijih tehnika molekularne kariotipizacije i njihove uloge u kliničkoj obradi oboljelih.

Ključne riječi: Mentalna retardacija ▪ Razvojno zaostajanje ▪ Citogenetika ▪ Molekularna kariotipizacija ▪ Metabolička ispitivanja

Uvod

Mentalna retardacija (MR) čest je problem koji je prisutan u 2-3% dječje populacije, a čak 5-10% djece zaostaje u jednom ili dva razvojna područja koja uključuju grubu/finu motoriku, razvoj govora, spoznajni razvoj, društveni razvoj, te sposobnosti uključivanja u svakodnevni život i aktivnosti (1). Pritom se za djecu mlađu od pet godina, kod koje se ne može formalnim testiranjem na pouzdan način provesti ispitivanje kvocijenta inteligencije, koristi pojam razvojnog zaostajanja (RZ).

Liječnici pedijatri u svojim ordinacijama redovito prate razvoj i napredovanje djece kao rutinski, sastavni dio skrbi za ovu populaciju. Posebna se pažnja posvećuje djeci koja su

bila izložena peripartalnim rizicima, koja imaju dismorfične crte i/ili pridružene malformacije ili opterećenu obiteljsku anamnezu. Ta su djeca nerijetko uključena u posebne evaluacijske programe educiranih stručnih timova koji prate njihov razvoj i po potrebi ih upućuju na odgovarajuće rehabilitacijske tretmane (2). Kada se uoči zaostajanje u razvoju tijekom rutinskih pedijatrijskih pregleda, jedan od prvih koraka je nastojati utvrditi razlog ovom poremećaju. Ispitivanje obično počinje pedijatar primarne zaštite no često je potrebno dijete uputiti na dalju obradu genetičaru ili neuropedijatru. Premda za ove poremećaje u većini slučajeva ne postoji čudotvoran lijek koji bi dijete izliječio, nego su pomaci spori, a rehabilitacijski programi multidisciplinski i zahtjevni, ipak je važno na vrijeme utvrditi uzrok. To omogućava predviđanje tijeka bolesti i mogućih komplikacija te genetičko savjetovanje koje uključuje procjenu rizika ponavljanja poremećaja u obitelji, mogućnost prevencije putem prenatalne dijagnostike i ispitivanje rizičnih članova obitelji. U nekim slučajevima dijagnoza može modificirati rehabilitacijski program te uputiti na primjenu specifičnih oblika liječenja (3).

Uzroci razvojnih poremećaja su mnogobrojni. Premda uzrok često ostaje neutvrđen, smatra se da je preko polovice MR/RZ uvjetovano genetičkim čimbenicima (4). Ukoliko dijete ima dismorfične crte i/ili pridružene malformacije vanjskih struktura ili unutarnjih organa, vjerojatnost da je uzrok oštećenja genetički još je veća. Razvoj novih laboratorijskih metoda te slikovnih prikaza središnjeg živčanog sustava (SŽS) doveo je do toga da se dijagnoza postavlja kod sve većeg broja djece s razvojnim poteškoćama. S obzirom da je riječ o vrlo velikom broju pojedinačno rijetkih stanja, a da se stalno otvaraju nove dijagnostičke mogućnosti, pred liječnikom se postavlja pitanje kojim redoslijedom i u kojem opsegu napraviti obradu bolesnika koja bi bila ujedno i učinkovita i isplativa.

Ovaj rad daje prijedlog postupnika obrade kao i pregled i evaluaciju dijagnostičkih pretraga koje su nam na raspolaganju u rutinskoj obradi djece s MR/RZ.

Anamneza, klinički pregled i dijagnostika

Analiza studija koje evaluiraju pojedine metode koje se koriste u utvrđivanju uzroka MR/RZ s ciljem objedinjavanja rezultata i davanja neke opće preporuke gotovo je nemoguća, budući da se ispitivanja međusobno razlikuju u veličini i odabiru uzorka bolesnika te opsegu i temeljitosti obrade koja je ponajviše uvjetovana tehničkim mogućnostima pojedinih laboratorija. Većina ispitivanja se, međutim, slaže da je osnova svake obrade osobe sa MR/RZ uzimanje detaljne obiteljske i osobne anamneze bolesnika (5-11). Već na temelju podataka dobivenih anamnezom i detaljnim kliničkim pregledom nerijetko se mogu usmjeriti pretrage te dijagnozu potvrditi određenom citogenetičkom ili genskom analizom. Prema van Karnebeekovoj i sur., čak trećina dijagnoza temelji se samo na anamnezi i kliničkom pregledu, u drugoj trećini anamneza i klinički pregled su ključni za postavljanje dijagnoze, a samo u jednoj trećini za dijagnozu su ključne pretrage (9). Da bi rezultati kliničke evaluacije bolesnika bili ovako učinkoviti (ovo su iskustva tercijarnog centra) neophodno je: 1. kliničko znanje i iskustvo stručnjaka koji evaluira bolesnika, 2. redovito praćenje bolesnika, najčešće tijekom više godina i u razmacima koji ovise o dobi (češće u prvim godinama života, a jednom do dva puta u dobi malog i školskog djeteta), jer praćenje djeteta kroz duže razdoblje povećava za 5-20% uspješnost etiološke dijagnoze (12), 3. odgovarajući subspecialistički pregledi i multidisciplinski pristup (genetičar, neuropedijatar, psihijatar, logoped/defektolog, psiholog, okulista, otorinolaringolog, ortoped i dr.).

Od općih pretraga neophodnih u obradi bolesnika s MR/RZ ističe se važnost analize elektroencefalograma i slikovnih prikaza SŽS, pogotovu kod bolesnika s neurološkim odstupanjima (mikrocefalija/makrocefalija, konvulzije i druga neurološka odstupanja). EEG zapisi mogu pomoći ne samo uvođenju odgovarajuće terapije nego i postavljanju dijagnoze (npr. karakterističan nalaz u Angelmanovom sindromu) kao i boljem razumijevanju patogeneze poremećaja (13, 14). Slikovni prikazi SŽS uključujući ultrazvuk, kompjuteriziranu tomografiju (CT), magnetsku rezonanciju (MRI), ali i nove sofisticirane funkcionalne tehnike biti će važni u potvrdi perinatalnog oštećenja mozga koje je uzrok 20% MR/RZ, no u nekim će slučajevima neposredno ukazati i na genetičku etiologiju (5, 8, 10, 15, 16). Premda se strukturne abnormalnosti SŽS nerijetko nađu u djece s RZ, ne smije se zaboraviti da ne moraju ujedno biti i neposredan uzrok poremećaju, te da korist pretrage treba staviti na vagu u odnosu na potrebu opće anezezije kod djece mlađe dobi.

Laboratorijske analize

Laboratorijske analize mogu isključiti neke poznate vanjske čimbenike MR/RZ (npr. TORCH radi isključenja intrauterinih infekcija, analiza olova u krvi i dr.). Ispitivanja koja bi mogla pridonijeti utvrđivanju genetičke etiologije MR/RZ uključuju osnovne metaboličke pretrage, obično pod nazivom »metabolički probir« te razne citogenetičke i molekularne tehnike.

a) Metaboličke pretrage

Veći broj studija pokazao je da metabolička ispitivanja koja koriste neselektivne protokole (u većini studija one uključuju određivanje aminokiselina u serumu i urinu, organske acideurije, amonijaka, laktata i hormona štitnjače,

no pojam metaboličkog probira može biti i širi) u tek 0.6-1.3% slučajeva otkrivaju uzrok MR/RZ (5, 8). U slučajevima kada obiteljska ili osobna anamneza, odnosno fizikalni pregled upućuju na moguću metaboličku bolest, odnosno ako je riječ o homogenim populacijama sa specifičnim zdravstvenim problemima, vjerojatnost da će se otkriti uzrok je nešto veća (3-5%) (8). Uspješno organizirani novorođenački probiri u pojedinim sredinama značajno smanjuju značenje metaboličkih testova u starijoj dobi, pogotovu ukoliko uključuju tandemsku spektrometriju masa. Od metaboličkih poremećaja, posebno se treba usredotočiti na manji broj bolesti koje većinom zasad nisu uključene u novorođenačke probire, a koje se danas mogu liječiti (mukopolisaharidoze, Gaucherova, Fabryjeva, Pompeova bolest). Svi ovi poremećaji zahvaćaju više organa i sustava, te pored RZ imaju i niz drugih simptoma i fizičkih znakova (npr. česte infekcije gornjih dišnih puteva, slabo napredovanje, Hurlerin fenotip, povećanje jetre i slezene, izražena hipotonija, kardiomegalija i sl.). Ti znaci mogu biti u početku suptilni i bitno ih je prepoznati upravo tada, dok bolest još nije uzela maha kako bi liječenje bilo što djelotvornije (17, 18, 19). Neophodno je misliti i na poremećaje glikozilacije koji mogu imati nespecifičnu kliničku prezentaciju a koji su nedovoljno prepoznati i dijagnosticirani zbog nedostupnosti odgovarajućih testova (s izuzetkom izoelektričnog fokusiranja transferina) (20). U nedostatku pridruženih simptoma korist metaboličke obrade nije velika, pa je treba koristiti racionalno (21, 22).

b) Standardna i molekularna kariotipizacija

Citogenetičke abnormalnosti su najvažniji uzrok MR/RZ. Standardne metode kariotipizacije pruganjem na razini od 550 pruga (G, R i C pruge) omogućavaju pregled ljudskog

genoma na razini razlučivanja od ~ 5-10 Mb. Ovako veliki manjak/višak DNA predstavlja u pravilu veći poremećaj ravnoteže genoma bez obzira o kojem je kromosomu/kromosomskoj regiji riječ. Stoga promjene vidljive na standardnom kariotipu najčešće dovode do poremećaja tjelesnog i duševnog rasta i razvoja, pojave malformacija unutarnjih organa i sustava i/ili vanjskih struktura te pojave dismorfičnih/displastičnih crta.

Prema rezultatima većeg broja ispitivanja standardna kariotipizacija otkriva uzrok poremećaja u 4-34,1% osoba s MR/RZ (5, 7, 8, 10, 23). Ove velike razlike u djelotvornosti kariotipizacije u otkrivanju uzroka MR/RZ uvjetovane su različitim ispitnim skupinama, njihovom veličinom, primijenjenim tehnikama (vrste pruganja i rezolucija) i dr. Sustavnim pregledom velikog broja studija koje su obuhvaćale različite vidove dijagnostike MR/RZ, uključujući i citogenetičke analize, van Karnebeck i sur. nalaze da klasičnim citogenetičkim metodama možemo u prosjeku otkriti uzrok u 9,5% osoba s MR/RZ (od 5,4% u školskoj populaciji do 13,3% kod bolesnika smještenih u odgovarajućim institucijama) (10). Rauchova i sur. u skupini od 570 bolesnika s RZ koji su prethodno pregledani i selekcionirani za citogenetičku obradu nalaze patološki nalaz standardnog kariotipa u 15% ispitanih (23). Riječ je o izvrsnom referentnom laboratoriju, pa to jasno ukazuje koliko uspješnost metode ovisi o iskustvu i temeljitosti ispitivanja. Primjena tehnika visoke rezolucije (>550 pruga) povećava vjerojatnost otkrivanja abnormalnosti za dodatnih 3-4%. S obzirom na to da ovako visok udio citogenetičkih aberacija u etiologiji MR/RZ, standardna kariotipizacija predstavlja zlatni standard obrade i indicirana je kod svih osoba s MR/RZ, bez obzira da li imaju pridružene malformacije i/ili dismorfiju i bez obzira na razinu zaostajanja (10, 24). Početkom 90-tih godina uočeno je da su male delecije genoma koje nisu vidljive pod svjetlosnim mikroskopom predstavljaju uzrok ve-

ćeg broja poznatih genetičkih sindroma. To je bio početak razvoja tzv. *molekularne citogenetike* koju često nazivamo i *molekularna kariotipizacija*. Naime, mikrodelecije se mogu prikazati samo posebnim tehnikama, od kojih je danas najšire primjenjivana metoda FISH (fluorescencijska in situ hibridizacija). Pretpostavlja se da je udio mikrodelecija u skupini osoba s MR/RZ oko 5,3%, pa su one iza kromosomskih poremećaja vidljivih standardnom kariotipizacijom najčešći uzrok RZ (23-25). Uobičajeni mikrodelecijski sindromi uključuju cri du chat i Wolf-Hirschhornov sindrom, sindrom 22q11.2 (DiGeorge, velokardiofacijalni, Opitz G/BBB i Caylor kardiofacijalni sindrom), Williamsov, Prader Willijev, Angelmanov, Smith Magenisov, Miller Diekerov, Rubinstein Taybijev, Alagilleov i WAGR sindrom. Korištenjem modernijih citogenetičkih tehnika uočeni su i novi mikrodelecijski/mikroduplicacijski sindromi (del 1p36.3, del 2q22, del 3q29, dup 15q11-13mat, dup 15q11-13pat, inv dup 15mat, del 22q13.3) (4). U postavljanju dijagnoze mikrodelecijskih sindroma korištenjem FISH tehnike dva su osnovna problema: 1) za postavljanje indikacije za ciljanu FISH pretragu neophodno je točno poznavanje kliničke slike; 2) bolesnici imaju vrlo varijabilnu fenotipsku ekspresiju pa je klinička slika često netipična. Zbog toga se kod dijela bolesnika dijagnoza često nije postavljala ili se postavljala kasno.

Osim u dijagnostici mikrodelecijskih sindroma FISH metoda je našla svoje mjesto i u ispitivanju subtelomernih regija kromosoma. Subtelomerne su regije bogate genima, a zbog njihove specifične strukture sklone su raznim preraspodjelama genoma, najčešće delecijama i kriptičkim, submikroskopskim translokacijama. Ovakvi poremećaji nalaze se u 5-6% djece s RZ (26-30). S obzirom na to da je subtelomerni FISH skupa i složena metoda, obično su bolesnici preselekcionirani, najčešće prema de Vriesovim kriterijima (31). U ispitivanju djece s MR/RZ i/ili

malformacijama prema navedenim kriterijima u Laboratoriju za medicinsku genetiku Klinike za dječje bolesti Zagreb FISH metodom smo otkrili subtelomerni kriptički poremećaj u 6,4% bolesnika (32). Prije postavljanja definitivne dijagnoze potrebno je isključiti postojanje familijarnih polimorfizama subtelomernih područja koja mogu dovesti do pogrešnih zaključaka pri postavljanju dijagnoze (30). S obzirom na visok udio subtelomernih aberacija u skupini osoba s MR/RZ probir subtelomera ušao je u standardnu obradu ovih bolesnika (7, 10, 24).

Da bi se prebrodili nedostaci FISH tehnike i u jednom ili nekoliko postupaka omogućio pregled cijelog genoma a ne samo ciljanih regija, razvile su se nove tehnike molekularne kariotipizacije - komparativna genomna hibridizacija (CGH - *Comparative Genome Hybridisation*), komparativna genomna hibridizacija visoke rezolucije (HR-CGH - *High Resolution Comparative Genome Hybridisation*), CGH na matrici (*Array CGH*) te metoda višestrukog umnažanja vezanih sonda (MLPA - *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*).

CGH metoda omogućava pregled cijelog genoma u jednoj hibridizaciji, uključujući subtelomerne i intersticijske duplikacije/delecije. Međutim, njena je moć razlučivanja >5-10 Mb, pa tako nije puno bolja od kariotipizacije tehnikom visoke rezolucije. HR-CGH je modifikacija klasične CGH metode koja trostruko poboljšava osjetljivost metode (~ 3 Mb) (33). To je još uvijek slabija rezolucija od FISH metode kojoj moć razlučivanja odgovara veličini sonde (30-100 kb), no prednost je ove metode što prikazuje i intersticijske poremećaje. Njome možemo otkriti kriptičke aberacije u oko 12% osoba s MR/RZ i dismorfijom kod kojih je standardni kariotip uredan. Većinom je riječ o intersticijskim poremećajima, dok su subtelomerni poremećaji prisutni u oko 1/4 slučajeva (34).

Razvojem CGH metode došlo je do prenošenja hibridizacijskog postupka na silikon-

ske ili staklene, čvrste, kemijski odgovarajuće nosače na kojima su određenim redoslijedom poredani komadići DNA. Sonde na nosaču mogu biti klonirani DNA segmenti, cDNA, bakterijski umjetni kromosomi (BAC), polimorfizmi jednog nukleotida (SNP - *single nucleotide polymorphism*) ili oligonukleotidi, a njima je omogućeno ispitivanje ljudskog genoma na razini razlučivanja koja je ~ 50-1000 puta veća nego rutinska kariotipizacija. Komadići DNA mogu biti odabrani ciljano, tako da sadržavaju subtelomerne regije i mjesta gdje se nalaze poznati mikrodelecijski/duplikacijski sindromi (tzv. ciljane matrice, *targeted array*) ili su raspršeni po cijelom genomu (tzv. staza prekrivena po cijeloj površini, *tiling path*). Ova metoda otkriva 14-20% aberacija (oko 9-10% su intersticijske, a ostale subtelomerne) (35-40). Moć razlučivanja matrice ovisi o veličini komadića DNA i genomskom razmaku između njih. Novi *tiling-resolution BAC array* (matrica s razlučivanjem temeljenim na potpunom pokrivanju komadićima umjetnih kromosoma bakterija) ima deset puta veću pokrivenost genoma nego rutinski korištene BAC matrice koji imaju rezoluciju od oko 1 Mb (41). Metodom *array CGH* izbjegavamo probleme koji se javljaju u dijagnostici mikrodelecijskih sindroma - potrebu za točnim poznavanjem većeg broja rijetkih kliničkih slika i dijagnostičke teškoće koje proistječu iz različite fenotipske ekspresije, jer je to probirna metoda kojom uočavamo višak/manjak genetičkog materijala u cijelom genomu, pa i u navedenim regijama. Nedostatak metode je u tome da registrira razlike u broju kopija (CNV - *copy number variants*) koje doista mogu biti uzrok poremećaja kod bolesnika, ali mogu biti i benigne polimorfne varijante prisutne unutar normalne populacijske raznolikosti. Stoga je potrebno testiranje roditelja i konzultacija baza podataka o normalnim varijantama u populaciji te usporedba fenotipa bolesnika s kliničkom prezentacijom onih kod kojih je otkrivena ista razlika u broju kopija (38, 42). Drugi nedostatak ove metode

je njena relativna skupoća i zasad nedostupnost za rutinsku kliničku praksu. Može se očekivati da će se s vremenom steći veće iskustvo u tumačenju nalaza te da će ova metoda postati dostupna u rutinskom radu. Prema prvim iskustvima laboratorija koji koriste metodu matrica DNA, isplativije je ovu metodu koristiti za prvi probir bolesnika umjesto standardne kariotipizacije (43).

Posljednjih je godina u rutinsku praksu mnogih laboratorija ušla metoda višestrukog umnažanja vezanih sonda (MLPA, *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) (44). Riječ je o brzom i relativno jeftinoj kvantitativnoj metodi molekularne citogenetike kojom se može u nekoliko postupaka ispitati niz sindroma vezanih sa MR/RZ korištenjem nekoliko SALSA MLPA komercijalnih kitova. MLPA kitovi za probir subtelomera dizajnirani su za otkrivanje delecija/duplikacija subtelomernih regija svih kromosoma. Učestalost otkrivenih submikroskopskih poremećaja subtelomernih regija metodom MLPA pri standardnom probiru bolesnika prema de Vriesu i sur. je oko 5-6% (45-48). Stegman i sur. su u dosad najvećoj studiji ispitivanja učinkovitosti MLPA metode otkrili 3,9% kriptičkih aberacija (18/466) - šest terminalnih delecija, osam nebalansiranih translokacija tri sindroma Prader Willi i jedan subtelomernu intersticijsku deleciju. Ova je metoda značajno poboljšala stopu otkrivanja uzroka MR u njihovom laboratoriju - od 8,3% bez MLPA do 12,2% s MLPA metodom (48). S obzirom na jednostavnost i dostupnost metode, moguće je ispitivanje svih bolesnika s MR neovisno o prisutnoj dismorfiji i kongenitalnim anomalijama. U našem laboratoriju ispitali smo metodom MLPA 50 bolesnika s MR urednog citogenetskog nalaza. Poremećaj submikroskopskih subtelomernih regija otkriven je u dva (4%) ispitanika. Kod jedne bolesnice je prisutna terminalna delecija (22qtel), a kod druge aberacija je bila posljedica nebalansirane kromosomske translokacije (monosomija 12ptel i trisomija 22qtel) (49).

Sonde MRS-MLPA P064 otkrivaju česte mikrodelecijske sindrome (1p36, Williams, Smith-Magenis, Miller-Dieker, DiGeorge, Prader-Willi, Alagille te sindrome Saethre-Chotzen i Sotos). Uporabom ovog kita Kirchhoff i suradnici su postavili dijagnozu u 5,8% (15/258) bolesnika s MR/RZ (50). Na raspolaganju su i mješavina sonda P096 MR2 za otkrivanje skupine mikrodelecijskih sindroma i drugih poremećaja vezanih za MR/RZ (Wolf-Hirschhorn, cri du chat, Langer-Giedon, WAGR, Rubinstein-Taybi, Downov i Kabuki make up sindrom) kao i druge mješavine sonda za specifične kromosome ili regije kromosoma.

c) Molekularna genetika

Monogeni sindromi su uzrok MR/RZ u oko 5-10% osoba. Kod većeg broja monogenih sindroma poznati su geni, a analiza genskih mutacija dostupna je u kliničkoj praksi.

Najčešće je riječ o genima vezanim za X kromosom, a od X - vezanih MR najčešći je sindrom fragilnog X kromozoma. On je uzrok oko 3% MR/RZ, pa je gensko testiranje za FRAXA (gen FMR1) indicirano napraviti kod svake muške osobe s razvojnim zaostajanjem (5, 8, 10). Uspješnost otkrivanja ovisi o preselekciji bolesnika na temelju kliničkog pregleda i obiteljske anamneze. Postoji veći broj kliničkih lista za probir bolesnika, od kojih su se neke zbog svoje dužine pokazale nepraktičnim. Pokazali smo da jednostavan probir bolesnika temeljen na pet točaka (pozitivna obiteljska anamneza, mentalna retardacija, smetnje ponašanja, velike uške, izduženo lice, makrocefalija) koje se boduju od 1 do 2 povećava učinkovitost dijagnoze za 3-6 puta. Uključivanjem u ispitivanje samo osoba s >5 bodova eliminirati ćemo 70% testiranja koje dovodi do negativnih rezultata (51).

Madrigal i sur. su ispitivanjem 80 muškaraca s MR metodom MLPA korištenjem MRX sonda otkrili u 5% ispitanika aberacije u broju nu-

kleotidnih kopija koje se mogu smatrati uzrokom poremećaja (52). U analizi gena vezanih za X kromosom uspješno se koristi i array CGH (53).

Rettov sindrom koji se javlja s prevalencijom od 1 do 3 na 10.000 živorođenih, smatra se vodećim uzrokom MR/RZ kod djevojčica. U oko 80% bolesnica nalazimo mutaciju u genu *methyl-CpG-binding protein 2* (MECP2). Pored klasične kliničke slike, javljaju se i atipični oblici koje je teže prepoznati, a uključuju blaže očitovanje u vidu smetnji učenja, MR/RZ sa spasticitetom i tremorom nalik Angelmanovom sindromu te simptome pervazivnog razvojnog spektra. Uočeno je da i u manjem broju muške djece možemo naći MECP2 mutacije. Najčešće je riječ o teškim novorođenačkim encefalopatijama, no klinička slika može biti varijabilna (54). Analiza je indicirana u klinički preselekcijoniranih bolesnika. Strategija molekularnog testiranja zavisi o metodama koje se primjenjuju u pojedinom laboratoriju. U našem laboratoriju prvo se testiraju mutacije u eksonima 3 i 4 korištenjem tehnika zasnovanih na PCR-u kao što je DHPLC (engl. *denaturing high performance liquid chromatography*) i potom sekvenciranje, budući da se većina mutacija nalazi u ovim regijama. Ukoliko se patogena mutacija ne nađe, nastavlja se testiranjem eksona jedan i dva. Kod onih bolesnika kod kojih nisu nađene patogene mutacije u eksonima 1-4 radi se probir na velike delecije MLPA metodom korištenjem komercijalnog kita (MRC-Holland) (55, 56).

Molekularne tehnike koriste se i za dijagnostiku uniparentne disomije (UDP) koja u manjem broju bolesnika može biti uzrok MR/RZ

(posebno kromosomi 7, 11, 14, 15). Za razlikovanje porijekla roditeljskih kromosoma koristimo polimorfne mikrosatelitne markere kojima se također mogu analizirati i subtelomere, a služe i za točnije određivanje mjesta lomova kod strukturnih poremećaja utvrđenih standardnom kariotipizacijom (57).

Zaključak

Nove tehnike citogenetike i molekularne genetike omogućavaju opsežnu obradu osoba s MR/RZ. Osnova obrade su i dalje detaljna obiteljska anamneza i klinički pregled. Svakom djetetu s razvojnim zaostajanjem ili osobi s MR potrebno je napraviti standardnu kariotipizaciju, bez obzira na težinu zaostajanja i na to da li su prisutne dismorfične crte i/ili pridružene anomalije. Analiza gena FMR1 indicirana je također kod svih muških osoba s MR, no preporuča se klinička preselekcija. Dalji opseg i strategija obrade ovise prvenstveno o mogućnostima laboratorija. U slučaju urednog standardnog kariotipa, subtelomerni FISH indiciran je kod djece preselekcijonirane prema de Vriesovim (ili sličnim) kriterijima. Ukoliko su dostupne metode MLPA i array CGH, preporuča se napraviti analizu subtelomera kod sve djece bez obzira na stupanj MR/RZ ili pridružene anomalije/dismorfiju. Slikovni prikaz mozga indiciran je u prisutnosti morfoloških (mikrocefalija, makrocefalija) ili funkcionalnih neuroloških odstupanja. Metabolička ispitivanja indicirana su samo u slučajevima dodatnih simptoma/znakova. Ciljane genske analize, uključujući i gen MECP2 treba zasnivati na kliničkoj indikaciji.

Literatura

- Leonard H, Wen X. The epidemiology of mental retardation: Challenges and opportunities in the new millennium. *Mental Retard Dev Disabil Res Rev.* 2002;8:117-34.
- Rydz D, Shevell MI, Majnemer A, Oskoui M. Developmental screening. *J Child Neurol.* 2005;20:4-21.
- Barišić I, Petković I, Hećimović S. Evaluacija genetičkih uzroka mentalne retardacije. *Liječ Vjesn.* 2003;125:71-7.
- Barišić I, Marušić Della Marina B. Genetičke osnove razvojnog zaostajanja/mentalne retardacije. *Pediatr Croat.* 2007;51(4):191-200.

5. Curry CJ, Stevenson RE, Aughton D, Byrne J, Carey JC, Cassidy S, et al. Evaluation of mental retardation: recommendations of a Consensus Conference: American College of Medical Genetics. *Am J Med Genet.* 1997;72:468-77.
6. Moeschler JB, Shevell M. American Academy of Pediatrics Committee on Genetics. Clinical genetic evaluation of the child with mental retardation or developmental delays. *Pediatrics.* 2006;117(6):2304-16.
7. Battaglia A, Carey JC. Diagnostic evaluation of developmental delay/mental retardation: An overview. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2003;117(1):3-14.
8. Shevell M, Ashwal S, Donley D, Flint J, Gingold M, Hirtz D, et al. Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology; Practice Committee of the Child Neurology Society. Practice parameter: evaluation of the child with global developmental delay: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and The Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology.* 2003;60(3):367-80.
9. van Karnebeek CD, Scheper FY, Abeling NG, Alders M, Barth PG, Hoovers JM, et al. Etiology of mental retardation in children referred to a tertiary care center: a prospective study. *Am J Ment Retard.* 2005;110(4):253-67.
10. 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.
11. Srour M, Mazer B, Shevell MI. Analysis of clinical features predicting etiologic yield in the assessment of global developmental delay. *Pediatrics.* 2006;118(1):139-45.
12. Shevell MI, Majnemer A, Rosenbaum P, Abrahamowicz M. Etiologic yield of single domain developmental delay: a prospective study. *J Pediatr.* 2000;137(5):633-7.
13. Sheth RD. Electroencephalogram in developmental delay: specific electroclinical syndromes. *Semin Pediatr Neurol.* 1998;5(1):45-51.
14. Battaglia A, Bianchini E, Carey JC. Diagnostic yield of the comprehensive assessment of developmental delay/mental retardation in an institute of child neuropsychiatry. *Am J Med Genet.* 1999;82:60-6.
15. Battaglia A. Neuroimaging studies in the evaluation of developmental delay/mental retardation. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2003;117:25-30.
16. Rodriguez DP, Poussaint TY. Neuroimaging of the child with developmental delay. *Top Magn Reson Imaging.* 2007;18(1):75-92.
17. Barišić I. Mukopolisaharidoze - genska i fenotipska heterogenost. *Paediatr Croat.* 2005;49(3):141-50.
18. Barišić I. Kako prepoznati i liječiti Pompeovu bolest? *Medix.* 2006;67:111-5.
19. Tokić V, Barišić I, Huzjak N, Petković G, Fumić K, Paschke E. Enzyme replacement therapy in two patients with an advanced severe (Hurler) phenotype of Mucopolysaccharidosis I. *Eur J Pediatr.* 2007;166(7):727-32.
20. Grünewald S. Congenital disorders of glycosylation: rapidly enlarging group of (neuro)metabolic disorders. *Early Hum Dev.* 2007;83(12):825-30.
21. Cleary MA, Green A. Developmental delay: when to suspect and how to investigate for an inborn error of metabolism. *Arch Dis Child.* 2005;90(11):1128-32.
22. McDonald L, Rennie A, Tolmie J, Galloway P, McWilliam R. Investigation of global developmental delay. *Arch Dis Child.* 2006;91(8):701-5.
23. Rauch A, Hoyer J, Guth S, Zweier C, Kraus C, Becker C, et al. Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am J Med Genet A.* 2006;140:2063-74.
24. Shaffer LG. American College of Medical Genetics guideline on the cytogenetic evaluation of the individual with developmental delay or mental retardation. *Genet Med.* 2005 (9):650-4.
25. Dave BJ, Sanger WG. Role of cytogenetics and molecular cytogenetics in the diagnosis of genetic imbalances. *Semin Pediatr Neurol.* 2007;14(1):2-6.
26. Knight SJ, Regan R, Nicod A, Horsley SW, Kearney L, Homfray T, et al. Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet.* 1999;354(9191):1676-81.
27. Jalal SM, Harwood AR, Sekhon GS, Pham Lorentz C, Ketterling RP, Babovic-Vuksanovic D, et al. Utility of subtelomeric fluorescent DNA probes for detection of chromosome anomalies in 425 patients. *Genet Med.* 2003;5(1):28-34.

28. Yu S, Baker E, Hinton L, Eyre HJ, Waters W, Higgins S, et al. Frequency of truly cryptic subtelomeric abnormalities--a study of 534 patients and literature review. *Clin Genet.* 2005;68(5):436-41.
29. Baroncini A, Rivieri F, Capucci A, Croci G, Franchi F, Sensi A, et al. FISH screening for subtelomeric rearrangements in 219 patients with idiopathic mental retardation and normal karyotype. *Eur J Med Genet.* 2005;48(4):388-96.
30. Ravnan JB, Tepperberg JH, Papenhausen P, Lamb AN, Hedrick J, Eash D, et al. 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.
31. Vries BBA de, White SM, Knight SJL, Regan R, Homfray T, Young ID, et al. Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist. *J Med Genet.* 2001;38:145-50.
32. Petković I, Barišić I. Probir subtelomernih regija metodom fluorescentne in situ hibridizacije (FISH) u 31-og bolesnika sa smetnjama u razvoju. *Paediatr Croat.* 2004;48(4):187-9.
33. Kirchhoff M, Gerdes T, Maahr J, Rose H, Bentz M, Dohner H, et al. Deletions below 10 megabasepairs are detected in comparative genomic hybridization by standard reference intervals. *Genes Chromosomes Cancer.* 1999;25:410-3.
34. Kirchhoff M, Pedersen S, Kjeldsen E, Rose H, Dunø M, Kolvraa S, et al. 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 A.* 2004;127(2):111-7.
35. Shaw-Smith C, Redon R, Rickman L, Rio M, Willatt L, Fiegler H, et al. 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(4):241-8.
36. Schoumans J, Ruivenkamp C, Holmberg E, Kyllerman M, Anderlid BM, 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.
37. Shaffer LG, Bejjani BA. Medical applications of array CGH and the transformation of clinical cytogenetics. *Cytogenet Genome Res.* 2006;115(3-4):303-9.
38. Stankiewicz P, Beaudet AL. Use of array CGH in the evaluation of dysmorphism, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation. *Curr Opin Genet Dev.* 2007;17(3):182-92..
39. de Ravel TJ, Devriendt K, Fryns JP, Vermeesch JR. What's new in karyotyping? The move towards array comparative genomic hybridisation (CGH). *Eur J Pediatr.* 2007;166(7):637-43.
40. Shaikh TH. Oligonucleotide arrays for high-resolution analysis of copy number alteration in mental retardation/multiple congenital anomalies. *Genet Med.* 2007;9(9):617-25.
41. de Vries BB, Pfundt R, Leisink M, Koolen DA, Vissers LE, Janssen IM, et al. Diagnostic genome profiling in mental retardation. *Am J Hum Genet.* 2005;77:606-16.
42. de Ravel TJ, Balikova I, Thienpont B, Hannes F, Maas N, Fryns JP, et al. Molecular karyotyping of patients with MCA/MR: the blurred boundary between normal and pathogenic variation. *Cytogenet Genome Res.* 2006;115(3-4):225-30.
43. Newman WG, Hamilton S, Ayres J, Sanghera N, Smith A, Gaunt L, et al. Array comparative genomic hybridization for diagnosis of developmental delay: an exploratory cost-consequences analysis. *Clin Genet.* 2007;71:254-9.
44. Schouten JP, McElgunn CJ, 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.
45. Koolen DA, Nillesen WM, Versteeg MH, Merckx GF, Knoers NV, Kets M, et al. Screening for subtelomeric rearrangements in 210 patients with unexplained mental retardation using multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). *J Med Genet.* 2004;41(12):892-9.
46. Rooms L, Reyniers E, Wuyts W, Storm K, van Luijk R, Scheers S, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification to detect subtelomeric rearrangements in routine diagnostics. *Clin Genet.* 2006;69(1):58-64.
47. Lam ACF, Lam STS, Lai KKS, Tong TMF, Chau TC. High rate of detection of subtelomeric

- aberration by using combined MLPA and subtelomeric FISH approach in patients with moderate to severe mental retardation. *Clin Biochem.* 2006;39(3):196-202.
48. Stegmann AP, Jonker LM, Engelen JJ. Prospective screening of patients with unexplained mental retardation using subtelomeric MLPA strongly increases the detection rate of cryptic unbalanced chromosomal rearrangements. *Eur J Med Genet.* Epub 2007 Oct 18.
 49. Morožin-Pohovski L. MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification) probir subtelomera u dijagnostici mentalne retardacije / razvojnog zaostajanja. U priručniku: *Suvremene spoznaje u dijagnostici i liječenju genetičkih bolesti - mentalna retardacija i razvojno zaostajanje - poslijediplomski tečaj stalnog medicinskog usavršavanja I. kategorije/Barišić I. (ur.), Zagreb: Sveučilište u Zagrebu - Medicinski fakultet i Klinika za dječje bolesti Zagreb, 2007.*
 50. Kirchhoff M, Bisgaard AM, Bryndorf T, Gerdes T. MLPA analysis for a panel of syndromes with mental retardation reveals imbalances in 5.8% of patients with mental retardation and dysmorphic features, including duplications of the Sotos syndrome and Williams-Beuren syndrome regions. *Eur J Med Genet.* 2007;50(1):33-42.
 51. Hećimović S, Barišić I, Pavelić K. DNA analysis of the fragile X syndrome in an at risk pediatric population in Croatia: simple clinical preselection criteria can considerably improve the cost-effectiveness of fragile X screening studies. *Hum Hered.* 1998;48:256-65.
 52. Madrigal I, Rodríguez-Revenga L, Badenas C, Sánchez A, Martínez F, Fernández I, et al. MLPA as first screening method for the detection of microduplications and microdeletions in patients with X-linked mental retardation. *Genet Med.* 2007;9(2):117-22.
 53. Froyen G, Van Esch H, Bauters M, Hollanders K, Frints SG, Vermeesch JR, et al. Detection of genomic copy number changes in patients with idiopathic mental retardation by high-resolution X-array-CGH: important role for increased gene dosage of XLMR genes. *Hum Mutat.* 2007;28(10):1034-42.
 54. Villard L. MECP2 mutations in males. *J Med Genet.* 2007;44(7):417-23.
 55. Matijević T, Knežević J, Barišić I, Čulić V, Rešić B. The MECP2 gene mutation screening in Rett syndrome patients from Croatia. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1091:225-32.
 56. Hardwick SA, Reuter K, Williamson SL, Vasudevan V, Donald J, Slater K, et al. Delineation of large deletions of the MECP2 gene in Rett syndrome patients, including a familial case with a male proband. *Eur J Hum Genet.* 2007;15(12):1218-29.
 57. Rosenberg MJ, Killoran C, Dziadzio L, Chang S, Stone DL, Meck J, et al. Scanning for telomeric deletions and duplications and uniparental disomy using genetic markers in 120 children with malformations. *Hum Genet.* 2001;109:311-8.

Summary

**DIAGNOSTIC APPROACH TO A CHILD WITH
DYSMORPHIC FEATURES AND DEVELOPMENTAL DELAY**

Ingeborg BARIŠIĆ

Referral Centre of the Ministry of Health and Social Welfare
for Surveillance of Congenital Anomalies in the Republic of Croatia,
Children's University Hospital Zagreb, Republic of Croatia

Mental retardation/developmental delay is a common clinical problem. Due to the etiologic heterogeneity, the diagnostic evaluation is often complex and expensive. Until recently the underlying cause remained unknown in more than half of the patients. In recent years advances in molecular cytogenetics have shown that cryptic genome imbalances are a significant cause of developmental delay. In this review we present recommendations for the evaluation of children with mental retardation and dysmorphic features/congenital anomalies, including the most appropriate clinical and laboratory investigations, with special focus on new molecular karyotyping techniques and their role in clinical practice.

Key words: Mental retardation ▪ Developmental delay ▪ Cytogenetics ▪ Molecular genetic tests ▪ Metabolic studies

Received: 31 December 2007

Accepted: 25 January 2008