

ИССЛЕДОВАНИЕ КАРИОТИПА ЧЕЛОВЕКА: ВЕРИФИКАЦИЯ ДИАГНОЗА

© Т. А. Гайнер,^{1, 2,*} В. Г. Матвеева,^{1, 2} О. Г. Каримова,^{1, 2} А. Р. Шорина,³
Н. Б. Рубцов,⁴ Т. В. Карамышева⁴

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, 630090,

² ООО «Центр персонализированной медицины», Новосибирск, 630090,

³ Государственный Новосибирский областной клинический диагностический центр,
Новосибирск, 630047,

и ⁴ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, 630090;

* электронный адрес: tatyana@cnmt.ru

При исследовании кариотипа с помощью классических цитогенетических методов перед врачом-цитогенетиком нередко встает вопрос о том, является ли обнаруженный у пациента морфологический хромосомный вариант нормой или это патология. Рассмотрены три случая, когда применение дополнительных методов анализа позволило получить точное и надежное описание хромосомных аномалий, что позволило дать обоснованный медико-генетический прогноз. В первом и втором случаях предварительный диагноз «транслокация» был снят, у пациентов выявлены редкие варианты нормального полиморфизма хромосом (21pstkstkpss и 20cenh+). В первом случае проведенная диагностика позволила сохранить беременность, во втором — рекомендовать использование методов ЭКО для деторождения. В третьем случае предварительный цитогенетический диагноз трисомия хромосомы 22 не подтвердился, у пациента была выявлена сверхчисленная маркерная хромосома, представляющая собой invdup(15)(q13), что позволяет предполагать существенно более благоприятный медико-генетический прогноз.

Ключевые слова: хромосомы человека, кариотип, цитогенетическое исследование, хромосомный полиморфизм, флуоресцентная гибридизация *in situ*.

Принятые сокращения: MX — маркерная хромосома, CBG — C-дифференциальное окрашивание (C-bands by barium hydroxide using Giemsa), GTG — G-дифференциальное окрашивание (G-bands by trypsin using Giemsa), NOR — ядрышковый организатор (nucleolar organizer region).

Во многих российских лабораториях медицинской генетики для исследования кариотипа используется в основном только GTG-окрашивание (G-окрашивание) хромосом. Оно выявляет специфическую поперечную исчерченность и позволяет четко идентифицировать хромосомы и их районы. Отклонение в структуре или количестве хромосом, как правило, говорит о наличии патологии. Исключение составляют вариабельные районы в хромосомах человека, размер которых и морфология могут различаться у разных индивидов. Это так называемый нормальный полиморфизм хромосом, который имеет разные степени выраженности — от малой до экстремальной. Присутствие полиморфизма, особенно в экстремальном варианте, следует подтверждать с помощью дополнительных методов окрашивания хромосом — CBG-окрашивания (C-окрашивания) и Ag-NOR-окрашивания (серебрения). C-окрашивание в норме выявляет небольшие блоки в прицентромерных районах всех хромосом, более крупные блоки гетерохроматина в прицентромерных районах длинных плеч хромосом 1, 9 и 16, блоки в коротких плечах акроцентрических хромосом и блок гетерохроматина в дистальной части длинного плеча Y-хромосомы, заметно варьирующий у разных лиц мужского пола. Се-

ребрение выявляет активные ядрышкообразующие районы с помощью окрашивания азотнокислым серебром. При этом в коротких плечах акроцентриков на спутниковых нитях выделяются черные образования — глыбки восстановленного металлического серебра. Размеры этих глыбок на разных хромосомах существенно варьируют — от отсутствия заметной окраски до достаточно крупных блоков.

Дополнительные виды окрашиваний не всегда легко воспроизводимы, требуют дополнительных затрат реактивов и рабочего времени. Однако в некоторых случаях применение этих методов абсолютно необходимо, позволяет уточнить кариотип пациента и прогноз.

Кроме перечисленных методов в ряде случаев для установления окончательного диагноза требуется использование молекулярно-цитогенетических методов анализа.

Материал и методика

Приготовление препаратов хромосом из лимфоцитов периферической крови, дифференциальное окрашивание хромосом проводили по стандартным методикам (Бара-

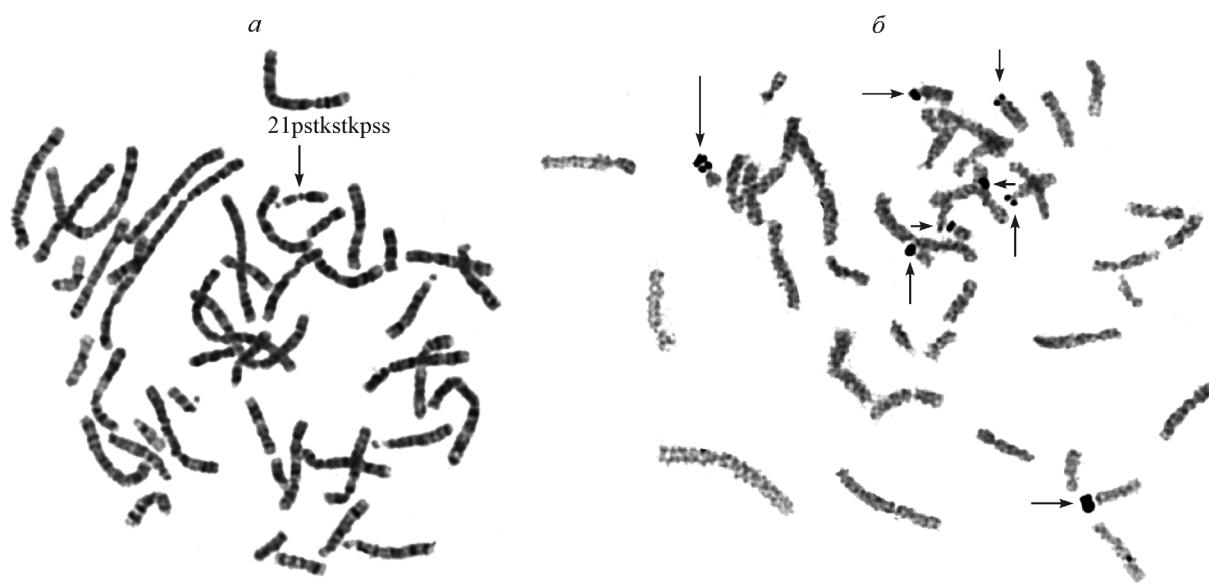


Рис. 1. Случай редкого варианта нормального полиморфизма хромосом 21pstkstkpss.

a — прометафаза, G-окрашивание. *б* — метафаза, серебрение; длинная стрелка указывает на двойной район ядрышковых организаторов хромосомы 21, короткие стрелки указывают на районы ядрышковых организаторов других ацентрических хромосом.

нов, Кузнецова, 2007). Хромосомы анализировали с помощью светового микроскопа OLYMPUS CX41 (Япония), для регистрации изображения использовали видеокамеру и программное обеспечение ВидеоТесТ-Карио 3.1 фирмы ООО Иста-ВидеоТесТ (Россия).

Приготовление препаратов метафазных и прометафазных хромосом для флуоресцентной гибридизации *in situ* проводили стандартным методом (Henegariu et al., 2001). Цитологические препараты метафазных хромосом для проведения микродиссекции готовили, как описано ранее (Rubtsov et al., 2000; Карамышева и др., 2001).

Микродиссекционные ДНК-пробы получали с помощью амплификации ДНК двух маркерных хромосом *invdup(15)(q11)* и *invdup(15)(q13)*, собранных с цитологических препаратов, как описано ранее (Rubtsov et al., 2000; Карамышева и др., 2001). Сбор материала хромосом проводили на инвертированном микроскопе Axiovert 10 (объектив 100×, окуляр 10×, Zeiss, Германия) с использованием оттянутой стеклянной иглы, контролируемой микроманипулятором MR (Zeiss, Германия). Собранный материал обрабатывали протеиназой K (Roche, Швейцария) и амплифицировали в полимеразной цепной реакции с частично вырожденным праймером MW6 (Telenius et al., 1992). ДНК-зонд получали при помощи 20 дополнительных циклов полимеразной цепной реакции, используя биотин-16-дУТФ и дигоксигенин-11-дУТФ (Invitrogen, США) (Rubtsov et al., 2000; Карамышева и др., 2001).

Супрессионную гибридизацию *in situ* с метафазными хромосомами лимфоцитов пациента проводили по стандартной методике (Lichter et al., 1988). ДНК-пробы, меченные биотином, детектировали с помощью avidin-FITC/биотинилированного антиавидин/авидин-FITC (Molecular Probes, США), ДНК-пробы, меченные дигоксигенином, выявляли с помощью анти-дигоксигенин-Су3-мышьиных антител (Jackson ImmunoResearch, США). После гибридизации *in situ* хромосомы окрашивали красителем DAPI (Sigma, Германия). Хромосомы и хромосомные районы идентифицировали, анализируя инвертированный DAPI-бэндинг. Для описания хромосом и хро-

мосмных районов использовали стандартную номенклатуру хромосом человека (Shaffer et al., 2009).

Результаты FISH анализировали в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН на микроскопе AXIOSKOP 2 Plus (Zeiss, Германия), для регистрации и обработки микроразображений использовали CCD-камеру, соответствующие комплекты фильтров фирмы Chroma, программное обеспечение AxioVision (Zeiss, Германия) и программное обеспечение ISIS35 (METASystemsGmbH, Германия).

Результаты и обсуждение

В описанных ниже случаях первичный цитогенетический анализ проводили в разных лабораториях медицинской цитогенетики России, повторный для уточнения диагноза — в Цитогенетической лаборатории Центра персонализированной медицины (Новосибирск).

Случай 1. У плода при первичном цитогенетическом анализе была выявлена хромосома 21 с дополнительным материалом на *p*-плече, имитировавшая несбалансированную транслокацию. Такая же хромосома была найдена у предыдущего ребенка в семье (10 лет, умственная отсталость) и у отца, имеющего нормальный фенотип. Дополнительных видов окрашивания не использовали, семья склонялась к прерыванию беременности. При повторном анализе кариотипа отца было использовано дополнительное окрашивание (серебрение), выявившее на коротком плече хромосомы 21 двойные спутничные нити и двойные спутники (экстремальный вариант нормального полиморфизма хромосом) (рис. 1, *a*, *б*). Кариотип пациента: 46,XY,21pstkstkpss. Вопрос о транслокации был снят, беременность у супруги сохранена.

Случай 2. У пациента с бесплодием при первичном цитогенетическом анализе был выявлен добавочный материал на *p*-плече хромосомы 20. Дополнительных видов окрашивания не использовали, семье отказали в проведении экстракорпорального оплодотворения и рекомендовали пациенту проведение молекулярной диагностики

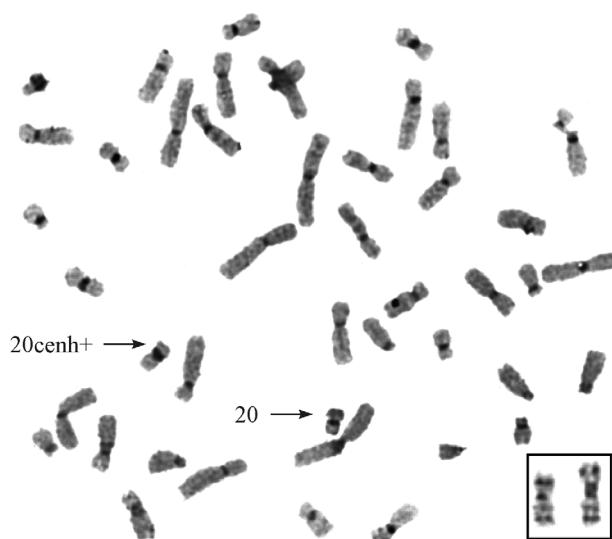


Рис. 2. Случай редкого варианта нормального полиморфизма хромосомы 20cenh+.

Метафазная пластина, С-окрашивание. Стрелками обозначены гомологи хромосомы 20. В рамке внизу — гомологи хромосомы 20 (справа — 20cenh+), G-окрашивание.

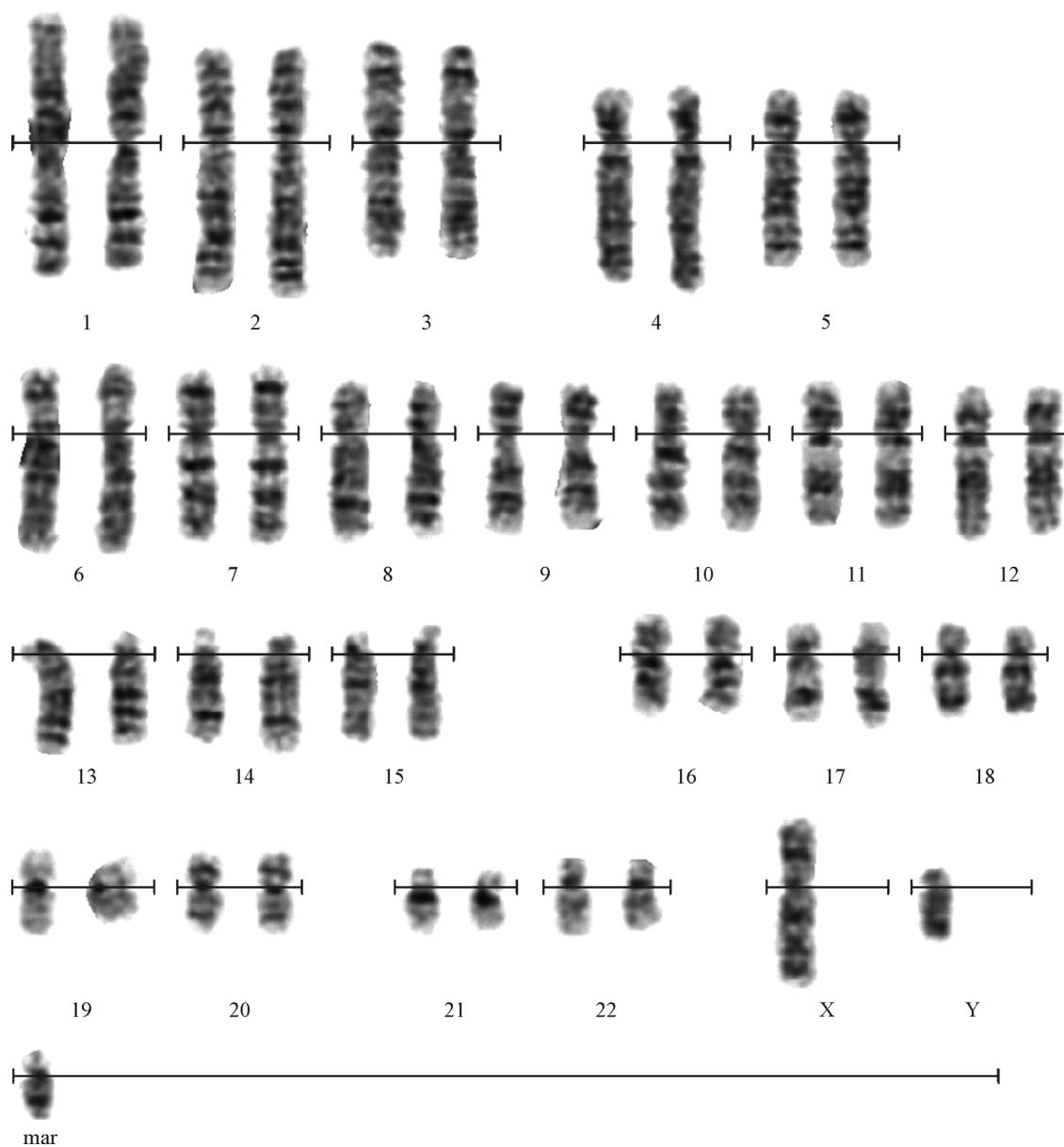


Рис. 3. Случай выявления маркерной хромосомы.
Кариограмма, G-окрашивание.

для установления окончательного диагноза. При повторном анализе кариотипа было выполнено С-окрашивание, которое показало, что дополнительный материал — это увеличенный прицентромерный гетерохроматин (редкий нетипичный вариант) (рис. 2). Кариотип пациента нормальный: 46,XY,20cenh+. Дорогостоящей молекулярной диагностики не потребовалось, в семье планируется деторождение с применением ЭКО.

В литературе встречаются сообщения о случаях подобного полиморфизма, которые иногда являются вариантом семейного носительства. В частности, описано увеличение прицентромерного гетерохроматина на хромосомах 6, 17 и 18 (Иванова, Лапутин, 2015).

Случай 3. Ребенку 2 лет с предварительным диагнозом «расщелина мягкого неба» при первичном цитогенетическом анализе был выставлен диагноз «трисомия хромосомы 22». Клиническое описание пациента приведено ниже.

Ребенок от второй беременности (в семье есть здоровая девочка). При рождении отмечалась задержка внутриутробного развития по гипопластическому типу.

Ребенок наблюдался у невролога с диагнозом «церебральная ишемия 2-й степени». Синдром двигательных, вегетовисцеральных дисфункций. Отмечается задержка психомоторного развития: удержание головы с 7 мес, сидеть стал с 1 года, на момент осмотра (2 года) ходит с посторонней поддержкой. Говорит 5—6 простых слов, на обращенную речь не реагирует.

Телосложение правильное, нормостеническое. Росто-весовые показатели в пределах возрастной нормы. При осмотре отмечены малые аномалии развития: макроцефалия, высокий лоб, гипертelorизм, монголоидный разрез глаз, широкое уплощенное переносье, эпикант, маленький короткий нос, рот «карпа», низкое расположение ушных раковин, макротия, сходящееся косоглазие, клинодактилия 5-х пальцев кистей, конусовидная деформация концевых фаланг кистей. Нижние конечности с вальгусной деформацией, частичная кожная синдактилия 2—3-х пальцев стоп. Двухсторонний крипторхизм. Рас-

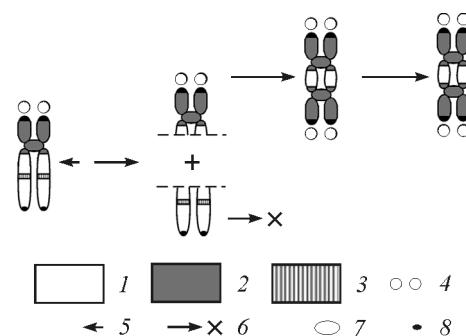


Рис. 4. Схема образования бисателлитного дицентрика.

1 — эухроматин, 2 — прицентромерный гетерохроматин и центромера, 3 — «горячие точки» хромосомных перестроек, 4 — спутники (содержат ЯОР), 5 — точка разрыва, 6 — потеря ацентрическогоragmentа в дальнейших делениях, 7 — инактивированная центромера в бисателлитном дицентрике, 8 — теломера.

щелина мягкого неба. По результатам эхокардиографии отмечены малые сердечные аномалии — добавочная хорда левого желудочка, открытое овальное окно.

Наблюдаемая у пациента клиническая картина не соответствовала таковой при трисомии хромосомы 22 (синдроме «кошачьего глаза»). В частности, у пациента не наблюдалось колобомы радужки и атрезии ануса, характерных для данного синдрома (Ворсанова и др., 2006). Кроме того, у него были выявлены макроцефалия и маленький короткий нос, в то время как для синдрома «кошачьего глаза» характерны микроцефалия и клювовидный нос. Поэтому врач-генетик отправил ребенка на повторное кариотипирование.

При повторном исследовании у ребенка была выявлена сверхчисленная маркерная хромосома (MX), имитирующая хромосому 22 (рис. 3). По литературным данным, около 80 % MX происходят из акроцентрических хромосом. Их основная часть представляет производные хромосомы 15 (около 60 %) (Blennow et al., 1994). Они были найдены как у фенотипически нормальных пациентов,

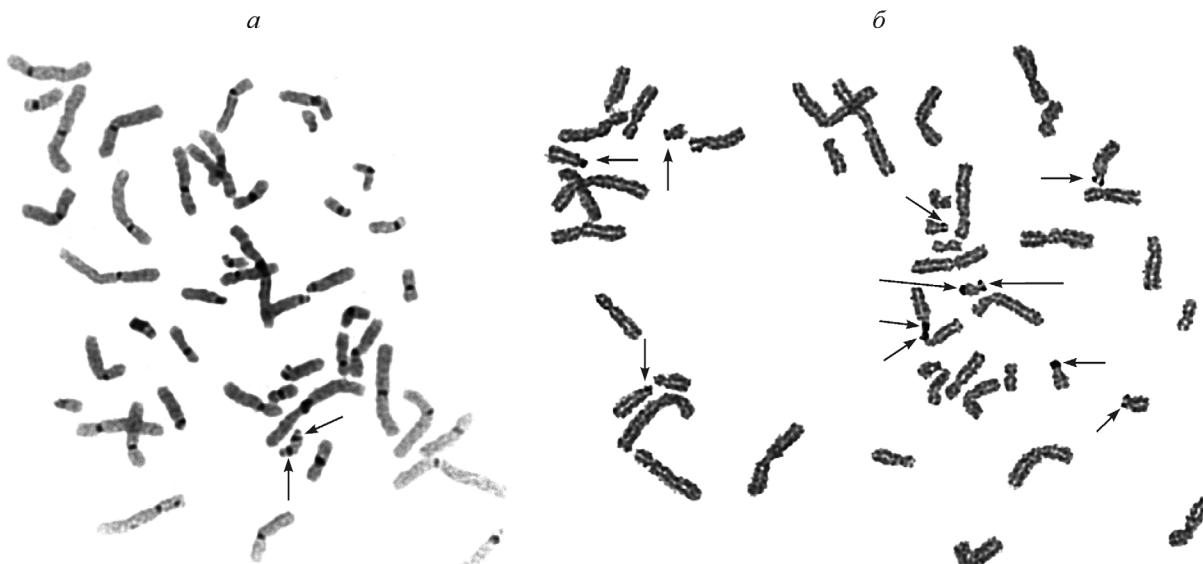


Рис. 5. Случай выявления маркерной хромосомы.

а — С-окрашивание; стрелки указывают на гетерохроматиновые районы в обоих плечах маркерной хромосомы. б — серебрение; длинные стрелки — на районы ядрышковых организаторов маркерной хромосомы, короткие — на районы ядрышковых организаторов других акроцентрических хромосом.

так и у пациентов с задержкой умственного развития. Часто в их состав входят две копии коротких плеч хромосомы 15, находящихся в инвертированной ориентации: invdup(15). Формирование МХ связано с разрывами хромосом и их ошибочной репарацией (рис. 4). В результате разрыва и дупликации формируются изохромосома, содержащая два центромерных района, и ацентрический фрагмент. В случае акроцентрической хромосомы возникает бисателлитный дицентрик, одна из центромер которых

инактивируется. Материал, локализованный между центромерами, может содержать эухроматиновые сегменты хромосомы 15 (Рубцов и др., 2003).

Большинство МХ, ассоциированных с врожденными пороками развития и умственной отсталостью, характеризуются наличием эухроматиновых сегментов (Wandstrat et al., 2000). Конкретное содержание таких сегментов в МХ и определяет их клиническое значение. Поэтому детекция эухроматиновых сегментов в маркерных хромосомах и идентификация их материала являются основной задачей цитогенетической диагностики.

Морфологически выявленная у ребенка МХ соответствовала инвертированной дупликации одной из акроцентрических хромосом. Это подтвердили два дополнительных вида дифференциального окрашивания хромосом. С-окрашивание выявило блоки гетерохроматина (рис. 5, а), серебрение — районы ядрышковых организаторов на обоих плечах МХ (рис. 5, б).

Определить точное происхождение МХ вследствие ее малого размера классическими цитогенетическими методами не удалось, но эти методы позволили сузить круг поиска до пяти хромосом. Кариотип ребенка был описан как 47,XY,+?invdup(13 or 14 or 15 or 21 or 22). Проведенное в Институте цитологии и генетики СО РАН исследование включало в себя определение происхождения и состава малой сверхчисленной МХ. Результаты супрессионной гибридизации *in situ* микродиссекционных ДНК-проб, приготовленных ранее из двух маркерных хромосом invdup(15)(q11) и invdup(15)(q13), позволили точно описать маркерную хромосому (рис. 6, а—в). ДНК-проба, приготовленная из invdup(15)(q11), окрашивала район 15(pter→q11), т. е. короткое плечо и С-позитивный пр центромерный район хромосомы 15. ДНК-проба, приготовленная из invdup(15)(q13), окрашивала район 15(pter→q13). Таким образом, район хромосомы, в котором выявляется сигнал только ДНК-пробы из invdup(15)(q13), соответствует эухроматиновому району 15(q11→q13).

В результате проведенных исследований сигнал ДНК-пробы invdup(15)(q11) был выявлен в районе 15(pter→q11) и в терминальных районах МХ пациента (рис. 6, а, зеленый сигнал), а сигнал ДНК-пробы invdup(15)(q13) был выявлен в районе 15(pter→q13) и на всей МХ пациента (рис. 6, а, красный сигнал). Полученные данные указывают на происхождение МХ из хромосомы 15 и наличие в ее составе материала эухроматинового района хромосомы 15(q11→q13). Сигналы в коротких плечах акроцентрических хромосом обусловлены наличием гомологичных последовательностей ДНК в спутниках всех акроцентрических хромосом человека. Таким образом, флуоресцентная гибридизация *in situ* микродиссекционных ДНК-проб, полученных из оха-

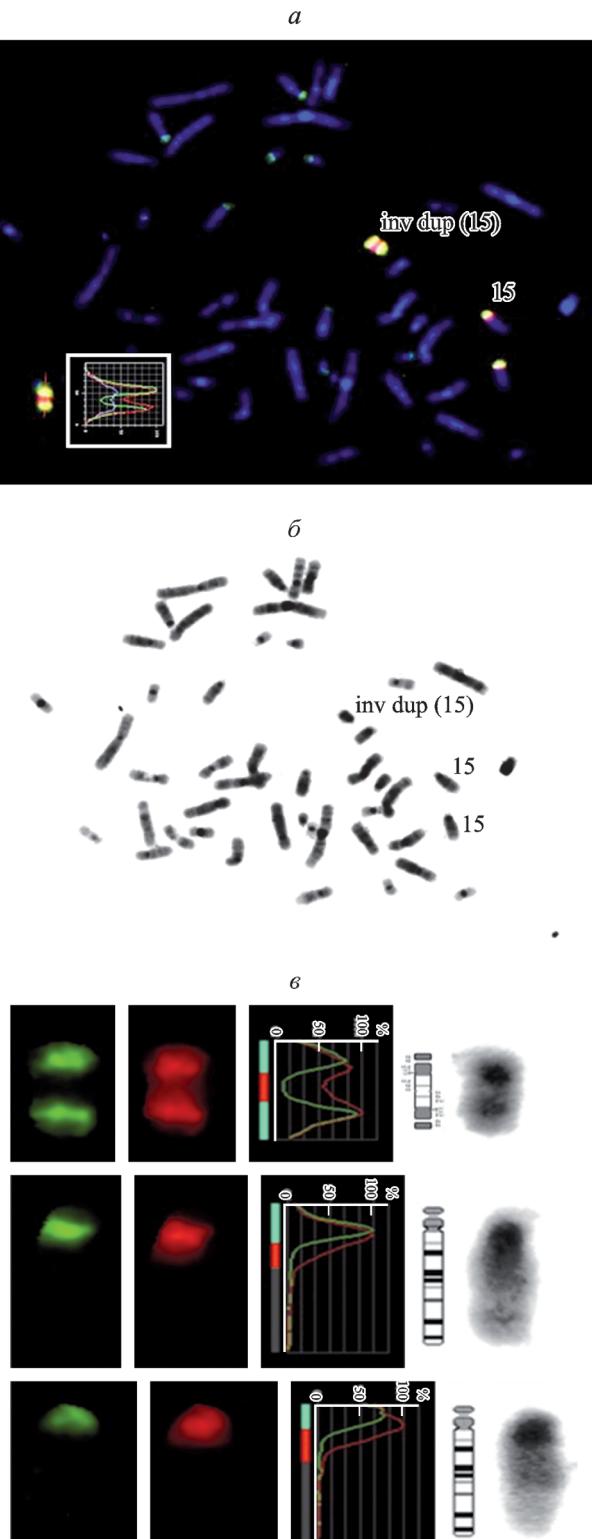


Рис. 6. Молекулярная диагностика для выявления происхождения и состава маркерной хромосомы.

а — двухцветная FISH районоспецифических ДНК-проб, полученных из охарактеризованных ранее МХ invdup(15) с метафазными хромосомами пациента; зеленый сигнал — сигнал FISH микродиссекционной ДНК-пробы, специфичной району 15(pter→q11.1), красный сигнал — сигнал FISH микродиссекционной ДНК-пробы, специфичной району 15(pter→q13), синий сигнал — окраска ДНК красителем DAPI, invdup(15) — маркерная хромосома, 15 — нормальные гомологи хромосомы 15; слева внизу представлены профили интенсивностей двух сигналов FISH по длине МХ пациента. б — инвертированный DAPI бэндинг. в — профили интенсивностей сигналов на МХ invdup(15) и гомологах хромосомы 15.

рактеризованных ранее маркерных хромосом, показала, что данная маркерная хромосома представляет собой invdup(15)(q13), кариотип пациента: 47,XY,+invdup(15)(q13).

Таким образом, приведенные материалы свидетельствуют об актуальности проблемы доказательности цитогенетического диагноза. Использование перечисленных методов анализа (С-окрашивание, серебрение и супрессионная гибридизация *in situ*) позволяет с высокой степенью точности описать кариотип пациентов, который является важной составляющей медико-генетического прогноза.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке бюджетного проекта Федерального исследовательского центра «Институт цитологии и генетики СО РАН» VI.53.1.4 VI.45.1.6. и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-00078).

Список литературы

- Баранов В. С., Кузнецова Т. В. 2007. Цитогенетика эмбрионального развития. СПб.: Изд-во Н-Л. 640 с. (Baranov V. S., Kuznetsova T. V. 2007. Cytogenetics of human embryonic development. St. Petersburg: N-L. 640 p.)
- Ворсанова С. Г., Юров Ю. Б., Чернышов В. Н. 2006. Медицинская цитогенетика. М.: Медпрактика-М. 300 с. (Vorsanova S. G., Yurov Yu. B., Chernyshov V. N. 2006. Medical cytogenetics. Moscow: Medpraktika-M. 300 p.)
- Иванова А. С., Лапутин И. А. 2015. Интересные случаи вариантов полиморфизма хромосом. Мед. генет. 14 (2) : 65—66. (Ivanova A. S., Laputin I. A. 2015. Unusual cases of chromosome polymorphisms. Med. Genet. 14 (2) : 65—66.)
- Карамышева Т. В., Матвеева В. Г., Шорина А. Р., Рубцов Н. Б. 2001. Клинический и молекулярно-цитогенетический анализ редкого случая мозаичизма по частичной моносомии 3р и частичной триисомии 10q у человека. Генетика. 37 (3) : 1—6. (Karamysheva T. V., Matveeva V. G., Shorina A. R., Rubtsov N. B. 2001. Clinical and molecular cytogenetic analysis of rare case of mosaicism with partial monosomy 3p and partial trisomy 10q in human. Russ. J. Genet. 37 (3) : 1—6.)
- Рубцов Н. Б., Карамышева Т. В., Гайнер Т. А., Шкляева О. А. 2003. Анализ маркерных хромосом: ДНК пробы для оценки возможного клинического значения маркерной хромосомы. Мед. генет. 2 (12) : 520—527. (Rubtsov N. B., Karamysheva T. V., Gayner T. A., Shklyava O. A. 2003. Analysis of marker chromosomes: DNA probes for the assessment of possible clinical significance of a marker chromosome. Med. Genet. 2 (12) : 520—527.)
- Blennow E., Bui T. H., Kristoffersson U., Vujic M., Anneken G., Holmberg E., Nordenskjold M. 1994. Swedish survey on extra structurally abnormal chromosomes in 39 105 consecutive prenatal diagnoses: prevalence and characterization by fluorescence *in situ* hybridization. Prenat. Diagn. 14 : 1019—1028.
- Henegariu O., Heerema N., Wright L., Bray-Ward P., Ward D., Vance G. 2001. Improvements in cytogenetic slide preparation: controlled chromosome spreading, chemical aging and gradual denaturing. Cytometry. 43 : 101—109.
- Lichter P., Cremer T., Borden J., Manuelidis L., Ward D. C. 1988. Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by *in situ* suppression hybridization using recombinant DNA libraries. Hum. Genet. 80 : 224—234.
- Rubtsov N., Karamysheva T., Babochkina T., Zhdanova N., Trifonov V., Starke H., Heller A., Junker K., Liehr T., Claussen U. 2000. A new simple version of chromosome microdissection tested by probe generation for 24-multi-color FISH, multi-color banding (MCB), ZOO-FISH and in clinical diagnostics. Med. Genet. 12 : 65.
- Shaffer L. G., Slovak M. L., Campbell L. J. (Editors). 2009. An international system for human cytogenetic nomenclature: recommendations of the International standing committee on human cytogenetic nomenclature. Basel, Switzerland: Karger.
- Telenius H., Carter N. P., Bebb C. E. 1992. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by single degenerate primer. Genomics. 13 : 718—725.
- Wandstrat A. E., Schwartz S. 2000. Isolation and molecular analysis of invdup(15) and construction of a physical map of a common breakpoint in order to elucidate their mechanism of formation. Chromosoma. 109 : 498—505.

Поступила 1 XII 2015

HUMAN KARYOTYPE ANALYSIS IN DIAGNOSIS VERIFICATION

T. A. Gayner,^{1, 2,*} V. G. Matveeva,^{1, 2} O. G. Karimova,^{1, 2} A. R. Shorina,³
N. B. Rubtsov,⁴ T. V. Karamysheva⁴

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, 630090,

² Center for Personalized Medicine, Ltd, Novosibirsk, 630090,

³ State Novosibirsk Regional Clinical Diagnostic Center, Novosibirsk, 630047,

and ⁴ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, 630090;

* e-mail: tatyana@cnmt.ru

When analyzing a patient's karyotype using classic cytogenetic tools, clinical cytogeneticists frequently face a problem of whether the observed morphological variant of a chromosome is the norm or pathology. Here we present three cases, when the use of additional approaches allowed us to accurately and reliably describe the chromosomal abnormalities and to provide a substantiated medical and genetic prognosis. Translocations were preliminary diagnosed in the first two patients. This opinion was subsequently challenged, as these patients were the carriers of rare variants of normal chromosome polymorphisms (21pstkstkps and 20cenh+). Thus, these diagnostic measures helped the wife of the first patient to maintain the pregnancy, whereas the second patient was referred for IVF. In the third case, the preliminary diagnosis trisomy of chromosome 22 has not been confirmed. This patient turned out to be a carrier of a supernumerary marker chromosome invdup(15)(q13), which offers a much more favorable medical prognosis.

Key words: human chromosomes, karyotype, cytogenetic analysis, chromosomal polymorphism, fluorescence *in situ* hybridization.