

УДК 61.575, 616.89, 616.159:159.9

МОЗАИЦИЗМ ПО МОНОСОМИИ ХРОМОСОМЫ 21: НЕОБХОДИМОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ FISH МЕТОДА НА РАЗЛИЧНЫХ ТКАНЯХ ПРИ МОЗАИЦИЗМЕ НИЗКОГО УРОВНЯ

^{1,2}Колотий А.Д., ^{1,2,3}Юров Ю.Б., ^{1,2,3}Воинова В.Ю., ^{1,2,3}Ворсанова С.Г.,
^{1,2,3}Демидова И.А., ^{1,2,4}Юров И.Ю.

¹Обособленное структурное подразделение – НИКИ педиатрии ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, e-mail: svorsanova@mail.ru;

²ФГБНУ Научный центр психического здоровья, Москва, e-mail: y_yurov@yahoo.com;

³Московский городской психолого-педагогический университет, Москва;

⁴Кафедра медицинской генетики Российской Медицинской Академии Постдипломного Образования, Москва

Мы представляем редкий случай регулярной моносомии хромосомы 21 в культивированных лимфоцитах периферической крови, выявленной цитогенетическим анализом, у девочки в возрасте 9 месяцев с грубой задержкой психомоторного развития. Проведенное молекулярное кариотипирование (arrayCGH) также показало отсутствие гомолога хромосомы 21 в клетках крови. FISH методом был проведен поиск материала хромосомы 21 в лимфоцитах крови и в клетках буккального эпителия. ДНК проба на участок 21q22.13-q22.2 не выявила материала хромосомы 21 в той и другой ткани, тогда как центромерная проба D13Z1/D21Z1 позволила обнаружить хромосому 21 в 4% лимфоцитов крови в виде кольцевой хромосомы и в 80% в клетках буккального эпителия. Последующая FISH с сайтспецифичными ДНК пробами и многоцветовой пробой на хромосому 21 (МСВ) показала потерю короткого плеча и участка длинного плеча кольцевой хромосомы 21q22.11-qter в клетках лимфоцитов крови и буккального эпителия. Таким образом, в случаях мозаицизма низкого уровня необходимо исследование различных тканей молекулярно-цитогенетическими методами, такими как FISH и arrayCGH.

Ключевые слова: моносомия хромосомы 21, мозаицизм низкого уровня, FISH метод, грубая задержка развития

MONOSOMY OF 21 CHROMOSOME MOSAICISM: NECESSITY FISH USING TO DIFFERENT TISSUES AT LOW-LEVEL MOSAICISM

^{1,2,3}Kolotii A.D., ^{1,2,3}Yurov Y.B., ^{1,2,3}Voinova V.Y., ^{1,2,3}Vorsanova S.G.,
^{1,2,3}Demidova I.A., ^{1,2,4}Iourov I.Y.

¹Research and Clinical Institute for Pediatrics at the Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, e-mail: svorsanova@mail.ru;

²Mental Health Research Center, Moscow, e-mail: y_yurov@yahoo.com;

³Moscow state University of Psychology and Education, Moscow;

⁴Department of Medical Genetics, Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Ministry of Health, Moscow

We present a rare case of monosomy of chromosome 21 revealed by standard karyotyping in cultured peripheral blood lymphocytes in a 9 months old girl with severe developmental and psychomotor delay. An extended study using molecular karyotyping (array CGH) also provided the evidence for monosomy 21 in blood cells. FISH method with different DNA probes was used to identify the material of chromosome 21 in the lymphocytes and cells of buccal epithelium. DNA probes specific for chromosome region 21q22.13-q22.2 did not identify the material of chromosome 21 in these two tissues, whereas centromeric DNA probe D13Z1 / D21Z1 allowed to detect an additional chromosome 21 in 4% of lymphocytes in the form of marker and probably ring chromosome 21 and 80% in buccal epithelium cells. Subsequent FISH application with site-specific DNA probe and multicolor banding FISH specific to chromosome 21 (MCB FISH) showed the loss of the short arm and a portion of the long arm of chromosome 21 resulting in appearance of a ring chromosome in cells in blood lymphocytes and buccal epithelium. Thus, this study demonstrates that in cases of low level mosaicism it is necessary to investigate different tissues in affected subjects by molecular-cytogenetic techniques (FISH and array CGH).

Keywords: monosomy of chromosome 21, low-level mosaicism, FISH method, severe developmental delay

Мозаичная форма моносомии хромосомы 21 крайне редка, а регулярные формы этой хромосомной аномалии не совместимы с жизнью [1,8], тогда как трисомия хромосомы 21, известная как синдром Дауна, совместима с относительной продолжительностью жизни. Следует отметить, что моносомия хромосомы 21 среди жи-

ворожденных встречается исключительно в мозаичной форме. Известно около 10 живорождённых с регулярной моносомией хромосомы 21, подтверждённой молекулярными методами [3], однако утверждать, что в этих случаях отсутствовал тканевой мозаицизм, невозможно. Поэтому в случаях цитогенетического выявле-

ния регулярной моносомии хромосомы 21 у больного ребёнка необходимы дополнительные молекулярно-цитогенетические методы исследования различных тканей для обнаружения вероятного мозаицизма или выявления материала хромосомы 21 на другой хромосоме. Мы представляем случай, когда у девочки в возрасте 9 месяцев цитогенетическое исследование культивированных лимфоцитов периферической крови показало моносомию хромосомы 21: кариотип 45,XX,-21. Целью работы явился поиск гомологичных хромосом 21 в лимфоцитах крови и клетках буккального эпителия молекулярно-цитогенетическими методами.

Материалы и методы исследования

Цитогенетические исследования проводились на лимфоцитах периферической крови, культивированных 72 часа с применением GTG и CBG окрашивания хромосом по длине [9]. Молекулярно-цитогенетические исследования были проведены методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) на метафазных и интерфазных клетках культивированных лимфоцитах крови, а также на клетках буккального эпителия. Были использованы ДНК пробы на участки 21q22.13-q22.2 (LSI21), 21q22.11 и центромерная ДНК проба на хромосомы 13/21 (D13Z1/D21Z1) из оригинальной коллекции лаборатории цитогенетики и геномики психических заболеваний НЦ психического здоровья [12], а также многоцветовая ДНК проба на хромосому 21 – MCB21 (multicolor chromosome banding) [7]. Молекулярное кариотипирование (arrayCGH) проводилось на платформе Affymetrix Cytoscan HD по ранее описанной модификации метода [5].

Результаты исследования и их обсуждение

В работе представлено обследование девочки – третьего ребенка в семье. Старшие сибсы здоровы. В возрасте 9 месяцев вес ребенка составлял 7 кг, длина – 64 см, окружность головы 38,5 см (микроцефалия). Девочка имела грубую задержку психомоторного развития, крупные низко посаженные ушные раковины, буфтальм, глаукому, исход перфоративной язвы роговицы, выступающий лобный шов, скошенный затылок, асимметрию черепа в затылочной области, короткую шею, арahnодактилию, неправильное расположение пальцев кистей, уменьшенную нижнюю челюсть, грубую воронкообразную деформацию грудной клетки, вентрикуломегалию по данным МРТ, тромбоцитопению.

Цитогенетическое исследование выявило регулярную моносомию хромосомы 21 на основании анализа 35 метафазных пластин лимфоцитов периферической крови (рис. 1). Использование метода arrayCGH на ДНК, выделенной из клеток крови, подтвердило наличие моносомии хромосомы 21.

FISH с центромерной пробой на хромосомы 13/21 (D13Z1/D21Z1) позволила обнаружить хромосому 21 в метафазных клетках в виде кольцевой хромосомы и в интерфазных клетках в 4% лимфоцитов (рис. 2).

Для выявления материала хромосомы 21 применялись сайт-специфические ДНК зонды на участки 21q22.13-q22.2 и 21q22.11, из которых только последний давал сигнал в хромосоме 21 (рис. 3).

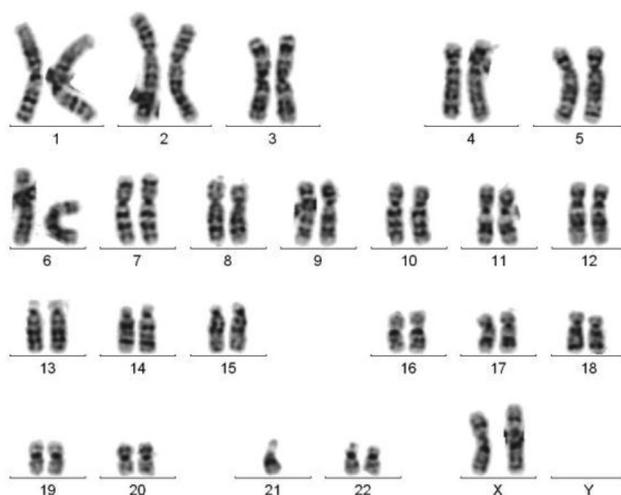


Рис. 1. Кариотип ребенка с моносомией хромосомы 21 при исследовании культивируемых лимфоцитов периферической крови

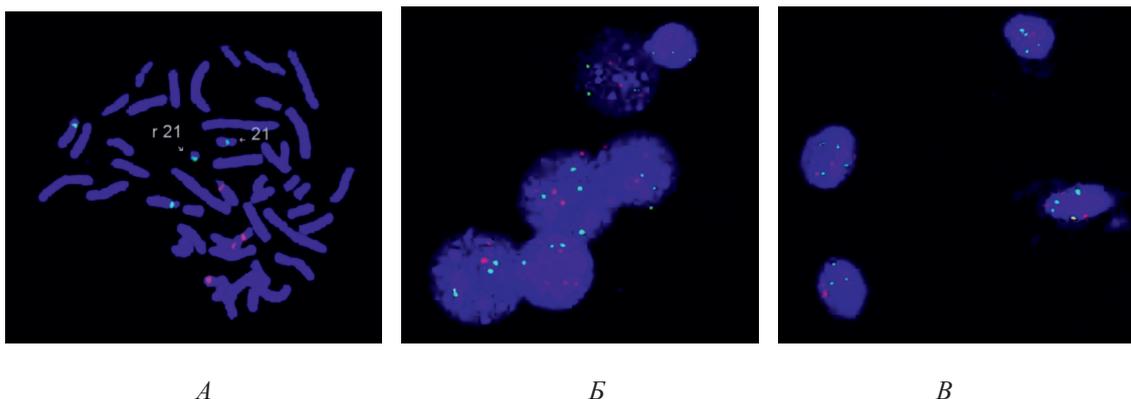


Рис. 2. Результаты FISH исследования с центромерной ДНК пробой на хромосомы 13/21 (зеленые сигналы) и с ДНК пробой на хромосомы 14/22 (красные сигналы, контрольная проба). А – метафазная пластинка культивированных лимфоцитов, одна из хромосом 21 представлена в виде кольцевой хромосомы. Б – интерфазная FISH на лимфоцитах крови, в одном ядре видны четыре зеленых сигнала, в остальных – три. В – интерфазная FISH на клетках буккального эпителия, в большинстве клеток по четыре зеленых сигнала, указывающие на присутствие материала двух хромосом 21 в ядре

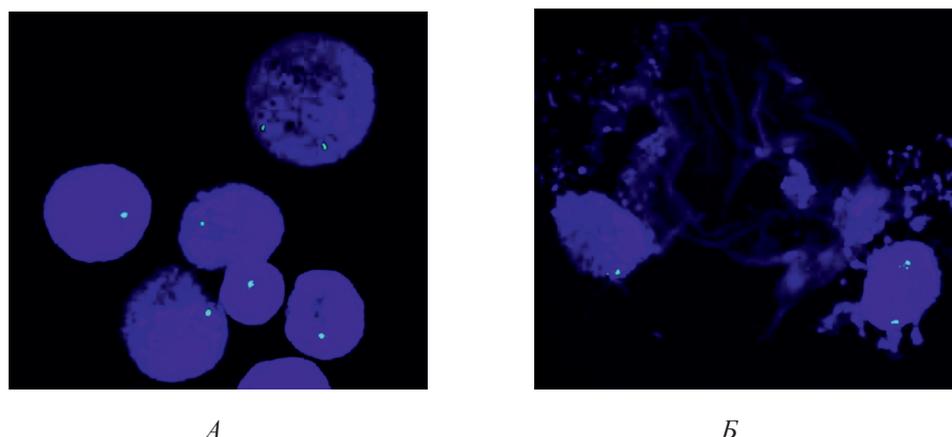


Рис. 3. Результаты интерфазного FISH исследования с ДНК пробой на участок 21q22.11. А – ядра лимфоцитов, Б – ядра клеток буккального эпителия. Два сигнала в ядрах указывают на присутствие участка 21q22.11 в гомологичных хромосомах 21

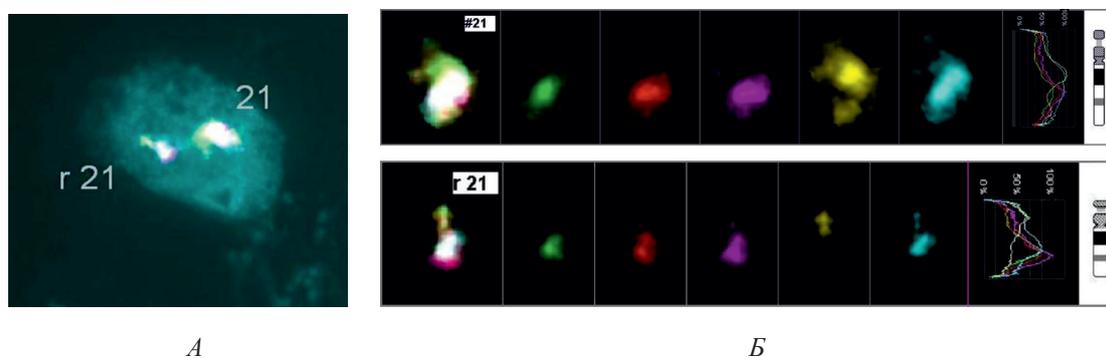


Рис. 4. Результаты исследования с многоцветовой ДНК пробой на хромосому 21 (МСВ), которая окрашивает участки хромосомы разным цветом. А – сигналы МСВ пробы в ядре клетки буккального эпителия. Б – цветовое распределение МСВ пробы в нормальной (вверху) и предположительно в кольцевой (внизу) хромосоме 21

Клетки буккального эпителия были проанализированы методом FISH с перечисленными ДНК пробями, а также с МСВ пробой. На основании полученных результатов было определено наличие фрагмента хромосомы 21 в 80% эпителиальных клеток. Характер распределения различных цветов МСВ пробы на хромосоме 21 в клетках буккального эпителия позволил предположить, что одна из хромосом 21 возможно является кольцевой [5, 6]. Таким образом, проведенные исследования позволили установить отсутствующий участок в длинном плече кольцевой хромосомы, как 21q22.11-qter. Кариотип девочки в лимфоцитах крови был записан как 45,XX,-21 [96]/46,XX,r(21)(p11q22.1) [4]. Анализируя клетки буккального эпителия следует сказать, что уменьшение размеров сигналов желтого цвета (соответствующего короткому плечу) и голубого цвета (соответствующего дистальной части длинного плеча) указывает на то, что одна из хромосом 21, по-видимому, является кольцевой (рис. 4).

В данной работе мы представили сложный случай хромосомной патологии. Известно, что моносомии аутосом несовместимы с жизнью, и встречаются в материале спонтанных аборттов [4, 10]. По данным литературы регулярная моносомия хромосомы 21 у живорожденных детей встречается крайне редко, и продолжительность жизни этих детей ограничена несколькими неделями [8]. В случае, когда моносомия хромосомы 21 выявляется у ребенка в 9 месяцев возникает предположение о вероятности наличия хромосомы 21 в клетках других тканей в мозаичной форме, либо в виде несбалансированной транслокации с участием хромосомы 21. Подобный случай был представлен в одной из наших работ, когда у девочки с регулярной моносомией хромосомы 21, материал этой хромосомы был встроен в хромосому 7, заместив ее участок такого же размера [11]. Эта перестройка была выявлена исключительно молекулярно-цитогенетическими методами. Исследование подобных случаев невозможно без применения молекулярно-цитогенетических и молекулярных технологий. В представленном нами случае были использованы практически все возможные современные молекулярно-цитогенетические методы, применяемые в медицинской цитогенетике: FISH, МСВ и arrayCGH. Молекулярно-цитогенетические исследования проводились в несколько этапов. Учитывая опыт исследования предыдущих подобных случаев, после цитогенетического анализа для выявления материала хромосом 21 в клетках ребенка был применен метод

arrayCGH. Этим методом подтвердилась регулярная моносомия хромосомы 21 в клетках крови, что позволило исключить несбалансированную структурную перестройку с участием утраченной хромосомы. Дальнейшей задачей являлся поиск возможного мозаицизма низкого уровня в лимфоцитах и клетках других тканей, который не выявлен методом молекулярного кариотипирования. Применение флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с использованием нескольких ДНК зондов и многоцветовой ДНК пробы на хромосому 21 (МСВ) позволило обнаружить материал хромосомы 21 в 4% лимфоцитов крови в виде кольцевой хромосомы и в 80% клеток буккального эпителия. По данным литературы и согласно нашим наблюдениям, все случаи кольцевых хромосом связаны с мозаицизмом [5,8], в частности с наличием клона клеток, в которых кольцевая хромосома отсутствует. Представленный нами случай демонстрирует мозаицизм в случае кольцевой хромосомы с большой потерей ее в клетках крови, по сравнению с клетками буккального эпителия. В литературе имеется описание подобного случая, приведенного в этой работе [2], когда у мальчика в возрасте трех с половиной лет в лимфоцитах периферической крови наблюдалась регулярная моносомия хромосомы 21, в то время как в 80% фибробластов была обнаружена кольцевая хромосома r(21)(p1q22). У ребенка были отмечены такие клинические проявления, как задержка моторного развития, задержка психоречевого развития, диспраксия, долихоцефалия, выступающий лоб, высокая граница роста волос, выющиеся волосы, эпиблефарон, тромбоцитопения, частые респираторные заболевания в младенчестве. Представленный нами случай отличается от приведенного в литературе описания [2] более тяжелыми клиническими признаками, возможно связанными с различным размером делеции в кольцевой хромосоме. Таким образом, случаи «псевдомоносомии» хромосомы 21, встречающиеся у детей, требуют более тщательного исследования различных тканей с применением современных молекулярно-цитогенетических методов для поиска материала не выявленной цитогенетическим методом хромосомы.

Исследования поддержаны грантом Российскойского научного фонда № 14-15-00411).

Список литературы

1. Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б., Чернышов В.Н. Медицинская цитогенетика (учебное пособие). – М.: МЕДПРАКТИКА-М, 2006. – 300 с.
2. Dalgleish R., Duckett D.P., Woodhouse M., Shannon R.S., Yong I.D. Apparent monosomy 21 owing to a ring

- 21 chromosome: parental origin revealed by DNA analysis // *J Med Genet.* – 1988. – Vol. 2. – P. 851–854.
3. Fisher D., Dipietro A., Murdison K.A., Lemieux C.A. Full monosomy 21: echocardiographic findings in the third molecularly confirmed case // *Pediatr Cardiol.* – 2013. Vol. 34. – № 3. – P. 733–735.
4. Hassold T., Chen N., Funkhouser J., Jooss T., Manuel B., Matsuura J., Matsuyama A., Wilson C., Yamane J.A., Jacobs P.A. A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions // *Ann Hum Genet.* – 1980. – Vol. 44. – P. 151–178.
5. Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Kurinnaia O.S., Zelenova M.A., Silvanovich A.P., Yurov Y.B. Molecular karyotyping by array CGH in a Russian cohort of children with intellectual disability, autism, epilepsy and congenital anomalies. // *Mol. Cytogen.* – 2012. – Vol. 5. – № 1/46. – 10 p.
6. Iourov I.Y., Liehr T., Vorsanova S.G., Yurov Y.B. Interphase chromosome-specific multicolor banding (ICS-MCB): a new tool for analysis of interphase chromosomes in their integrity. // *Biomolecular Engineering.* – 2007. – № 24. – P. 415–417.
7. Liehr T., Weise A., Heller A., Starke H., Mrasek K., Kuechler F., Weier H-U G., Claussen U. Multicolor chromosome banding (MCB) with YAC/BAC-based probes and region-specific microdissection DNA libraries // *Cytogen. Genome Res.* – 2002. – Vol. 97. – № 1–2. – P. 43–50.
8. Schinzel A. Catalogue of unbalanced chromosome aberrations in man. // Walter de Gruyter Inc., Berlin. – 2001. – 966 p.
9. Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. // *Lancet.* – 1972. – № 2. – P. 971–972.
10. Vorsanova S.G., Kolotii A.D., Iourov I.Y., Monakhov V.V., Kirillova E.A., Soloviev I.V., Yurov Yu.B. Evidence for high frequency of chromosomal mosaicism in spontaneous abortions revealed by interphase FISH analysis. // *J Histochemistry & Cytochemistry.* – 2005. – Vol. 53. – № 3. – P. 375–380.
11. Vorsanova S.G., Iourov I.Yu., Voinova-Ulas V.Yu., Weise A., Monakhov V.V., Kolotii A.D., Soloviev I.V., Novikov P.V., Yurov Yu.B., Liehr T. Partial monosomy 7q34-qter and 21pter-q22.13 due to cryptic unbalanced translocation t(7;21) but not monosomy of the whole chromosome 21: a case report plus review of the literature. // *Mol. Cytogen.* – 2008. – Vol. 1. – № 1. – P. 13–20.
12. Yurov Y.B., Soloviev I.V., Vorsanova S.G., Alexandrov I.A., Sharonin V.O., Monakhov V. DNA probes for pre- and postnatal diagnosis of chromosomal anomalies: a collection for FISH analysis. // *Cs Pediatr.* – 1997. – № 7. – P. 550–555.