

# ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

## Комплексная диагностика хромосомной патологии — дерибата хромосомы 4 и малой сверхчисленной маркерной хромосомы

Гайнер Т.А.<sup>1,2\*</sup>, Карамышева Т.В.<sup>3</sup>, Каримова О.Г.<sup>1,2</sup>, Корень О.Л.<sup>4</sup>,  
Шлома В.В.<sup>5,7</sup>, Шорина А.Р.<sup>6</sup>, Богомолов А.Г.<sup>3</sup>, Рубцов Н.Б.<sup>3,7</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск

<sup>2</sup> ООО «Центр персонализированной медицины», Новосибирск

<sup>3</sup> ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск

<sup>4</sup> ООО Центр семейной медицины «Здравица», Новосибирск

<sup>5</sup> ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск

<sup>6</sup> ГБУЗ Новосибирской области «Городская клиническая больница №1», Новосибирск

<sup>7</sup> Новосибирский государственный университет, Новосибирск

\* t.gainer@mail.ru

Цитогенетическая диагностика, проведенная только GTG-окрашиванием хромосом, не обеспечивает достаточной надежности и точности при идентификации структурно перестроенных хромосом. Для описания кариотипа в таких случаях требуется привлечение методов молекулярно-цитогенетического анализа. Целью данного исследования явилась отработка методов проверки, уточнения и коррекции результатов первичной цитогенетической диагностики комплексным использованием современных методов хромосомного анализа на примере двух пациентов с аномальными кариотипами. Выделение, культивирование лимфоцитов периферической крови, приготовление препаратов метафазных хромосом, GTG-, CBG-, Ag-NOR-дифференциальное окрашивание хромосом, супрессионную гибридизацию *in situ* проводили по стандартным протоколам. Получение и проверку качества микродиссекционных ДНК-проб выполняли, как описано ранее. Хромосомы после гибридизации *in situ* окрашивали красителем DAPI и идентифицировали, анализируя инвертированный DAPI-бэндинг. Используя GTG-, CBG-, Ag-NOR-дифференциальное окрашивание хромосом, супрессионную гибридизацию *in situ* специально подготовленных микродиссекционных ДНК-проб, кариотип пациента, ранее описанный как 46,XX,der(4)(4;?)(p12;?) or del(4)(p12p15.2), был определен как 46,XX,del(4)(p12p15.2), а кариотип пациента, ранее описанный как 47,XY,+22, был определен как 47,XY,+inv dup(15)(q13). Использование дополнительных методов цитогенетического анализа, включающего методы дифференциального окрашивания хромосом и флуоресцентную гибридизацию *in situ* специально подготовленных ДНК-проб, дает возможность уточнить и, при необходимости, исправить описание кариотипа, что, в свою очередь, позволило точно и надежно описать кариотипы пациентов. Уточнение цитогенетического диагноза имеет большое значение для медико-генетического прогноза.

**Ключевые слова:** хромосомы, кариотип, цитогенетическое исследование, микродиссекция метафазных хромосом, флуоресцентная гибридизация *in situ*, медико-генетический прогноз.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Работа частично поддержана проектом ИЦиГ СО РАН №0324-2016-0024 и грантом РФФИ № 16-34-00498 мол\_а.

Авторы статьи выражают благодарность к.б.н. В.Г. Матвеевой за помощь в работе над статьей.

### Comprehensive chromosomal pathology diagnostic of derivative of the 4 chromosome and the small supernumerary marker chromosome

Gayner T.A.<sup>1,2\*</sup>, Karamysheva T.V.<sup>3</sup>, Karimova O.G.<sup>1,2</sup>, Koren O.L.<sup>4</sup>,  
Shloma V.V.<sup>5,7</sup>, Shorina A.R.<sup>6</sup>, Bogomolov A.G.<sup>3</sup>, Rubtsov N.B.<sup>3,7</sup>

<sup>1</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk

<sup>2</sup> Center for Personalized Medicine, Ltd, Novosibirsk

<sup>3</sup> Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk

<sup>4</sup> Centers of family medicine «Zdravitsa», Ltd, Novosibirsk

<sup>5</sup> Institute of Molecular and Cellular Biology, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk

<sup>6</sup> State Novosibirsk regional budgetary institution « City clinical hospital №1», Novosibirsk

<sup>7</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk

\* t.gainer@mail.ru

Cytogenetic diagnosis performed only by GTG-staining does not provide sufficient reliability and accuracy in the identification of structurally rearranged chromosomes. To describe the karyotype in such cases, it is required to involve methods of molecu-

lar-cytogenetic analysis. The purpose of this study was to develop methods for testing, specification and correcting the results of primary cytogenetic diagnostics using complex methods of modern chromosomal analysis by two cases of patients with abnormal karyotypes. Separation and cultivation human peripheral blood lymphocytes, metaphase chromosome preparation, GTG-, CBG-, Ag-NOR-differential staining of chromosomes, chromosomal *in situ* suppression hybridization were done according to standard protocol. The creation of microdissection DNA probes and their quality control were performed as described previously. Chromosomes were counterstained with DAPI to visualize DNA after *in situ* hybridization. Inverted DAPI banding of chromosomes was used for chromosome identification, according to ISCN (2009). Using the GTG-, CBG-, Ag-NOR-staining of chromosomes, chromosomal *in situ* suppression hybridization with specially prepared microdissection DNA probes, the patient's karyotype, previously described as 46,XX,der(4)t(4;?)(p12;?) or del(4)(p12p15.2), was determined as 46,XX,del(4)(p12p15.2), and the patient's karyotype previously described as 47,XY,+22 was determined as 47,XY,+invdup(15)(q13). Applying methods of cytogenetic analysis, including methods of differential staining of chromosomes and fluorescent *in situ* hybridization with specially prepared DNA probes, allows to specify and, if necessary, to correct the description of the karyotype, resulting in accurate and reliable description of patient karyotypes. Clarification of the cytogenetic diagnosis is important for the medical-genetic predictions.

**Key words:** chromosomes, karyotype, cytogenetic tests, microdissection of metaphase chromosomes, fluorescence *in situ* hybridization, medico-genetic predictions.

### Введение

В настоящее время первичный кариотипический анализ пациентов, направленных на цитогенетическую диагностику, в большинстве российских и зарубежных лабораторий заключается в получении препаратов метафазных хромосом, их GTG (G-bands by trypsin using Giemsa)-окрашивании и анализе. Полученная при окрашивании специфическая поперечная исчерченность позволяет идентифицировать хромосомы и их районы. Однако при структурных хромосомных перестройках с участием небольших районов хромосом уровень разрешения, достижимый при использовании GTG-окрашивания, часто бывает недостаточным для постановки окончательного и надежного диагноза. Нередко не помогает даже исследование на прометафазных хромосомах. Особенную сложность для диагностики представляют небольшие несбалансированные транслокации, делеции, инсерции, а также маркерные хромосомы (MX). Уточнить кариотип пациента и дать ему обоснованный медико-генетический прогноз возможно привлечением дополнительных методов (CBG- и Ag-NOR-окрашивание, молекулярно-цитогенетические методы).

CBG (C-bands by barium hydroxide using Giemsa)-окрашивание (C-окрашивание) оказывается эффективным при анализе дополнительных и необычном увеличении стандартных C-позитивных районов хромосом, которые не приводят к нарушению баланса генов и могут быть рассмотрены как нормальный полиморфизм хромосом человека. В норме CBG-окрашивание 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 [1].

Ag-NOR (Nucleolar Organizer Region)-окрашивание (серебрение) выявляет активные ядрышкообразующие районы путем окрашивания азотокислым серебром [2]. При этом в коротких плечах акроцентриков на спутничных нитях выделяются черные образования — глыбки

восстановленного металлического серебра. Размеры этих глыбок на разных хромосомах существенно варьируют — от отсутствия заметной окраски до достаточно крупных блоков. Этот метод позволяет с достаточно большой вероятностью определять малые сверхчисленные хромосомы, возникшие из акроцентрических хромосом, а также транслокации материала коротких плеч акроцентрических хромосом на другие хромосомы человека.

Эти варианты дифференциального окрашивания, к сожалению, не относятся к рутинным методам. Они не всегда воспроизводимы, требуют дополнительных затрат реактивов и рабочего времени. Однако в некоторых случаях применение этих методов позволяет решать проблемы, с которыми не могут справиться ни полногеномное секвенирование, ни сравнительная геномная гибридизация на микрочипах, так как кластеры повторенных последовательностей не выявляются при секвенировании и часто не детектируются сравнительной геномной гибридизацией на микрочипах. Следует заметить, что еще целый ряд хромосомных перестроек оказывается «невидимками» для этих современных мощных методов геномного и хромосомного анализа. Например, от их внимания полностью ускользают сбалансированные транслокации, выявление которых очень важно при медико-генетическом консультировании пар, планирующих деторождение.

В настоящей статье на двух конкретных примерах мы рассмотрели варианты комплексной цитогенетической диагностики с использованием различных методов дифференциального окрашивания хромосом и гибридизации *in situ* для уточнения и коррекции описания кариотипа пациента. В статье также обсуждается необходимость и значение анализа аномального генома непосредственно для пациентов и для дальнейшего прогресса в медицинской генетике.

**Целью данного исследования** явилась отработка методов проверки, уточнения и коррекции результатов первичной цитогенетической диагностики комплексным использованием современных методов хромосомного анализа на примере двух пациентов с аномальными кариотипами.

## Материалы и методы

Родители детей, включенных в настоящее исследование, подписали информированное согласие на использование соответствующих биоматериалов для научных исследований.

Культивирование лимфоцитов периферической крови, приготовление препаратов и дифференциальное окрашивание хромосом проводили по стандартным методикам [3]. Приготовление препаратов метафазных и прометафазных хромосом для флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) проводили стандартным методом [4]. Дифференциально окрашенные хромосомы анализировали на световом микроскопе OLYMPUS CX41 (Япония), для регистрации изображения использовали видеокамеру и программное обеспечение ВидеоТесТ-Карго 3.1 ООО Иста-Видео ТесТ (Россия).

Цитологические препараты метафазных хромосом для проведения микродиссекции готовили, как описано ранее [5, 6]. ДНК-пробы, гомологичные короткому и длинному плечам хромосомы 4 (*случай 1*), получали из 10 копий соответствующих районов хромосомы 4 здорового донора, собранных с цитологических препаратов, окрашенных красителем Гимза. ДНК-пробы (*случай 2*) также получали методом микродиссекции, путем амплификации ДНК двух ранее описанных маркерных хромосом *inv dup(15)(q11)* и *inv dup(15)(q13)*, собранных с цитологических препаратов, как описано ранее [5, 6]. Сбор интересующего хромосомного материала проводили на инвертированном микроскопе Axiovert 10 (объектив 100x, окуляр 10x, Zeiss), используя специально оттянутую стеклянную иглу, контролируемую микроманипулятором MR (Zeiss, Германия). Собранный материал обрабатывали протеиназой K (Roche, Швейцария) и амплифицировали в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с частично вырожденным праймером 6MW, как описано ранее [5, 7]. Мечение ДНК, полученной в ДОП-ПЦР, проводили в дополнительных циклах ДОП-ПЦР в присутствии Alexa Fluor 488-5-dUTP (Molecular Probes, США), TAMRA-5-dUTP (Molecular Probes, США) [6]. FISH микродиссекционных ДНК-проб на метафазные хромосомы здорового донора и пациента проводили по стандартному протоколу CISS-гибридизации (*Chromosomal in situ Suppression hybridization*) с супрессией гибридизации повторенных последовательностей [8]. Общее окрашивание хромосом выполняли с использованием красителя DAPI (Sigma, Германия). Хромосомы и хромосомные районы идентифицировали, анализируя инвертированный DAPI-бэндинг. Для описания хромосом и хромосомных районов использовали стандартную номенклатуру хромосом человека [9].

Микроскопический анализ проводили на микроскопе AxioPlan 2 Imaging (Zeiss, Германия) с набором фильтров 49 (Zeiss, Германия), SP101 FITC (CHROMA, США) и SP103v1 Cy3tmv1 (CHROMA, США), CCD-камерой (CV M300, JAI Corporation, Япония). Для регистрации использовали программное обеспечение ISIS5

(METASystems GmbH). Микроскопию проводили в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН.

## Результаты и обсуждение

**Случай 1.** Восьмилетняя девочка с умеренными когнитивными и неврозоподобными нарушениями. Вес при рождении нормальный (3280 г). Оценка по шкале Апгар 8/9 баллов. Отставала в раннем психомоторном развитии. Ползала на четвереньках с 12 месяцев. Начало самостоятельной ходьбы в 18 месяцев. Фразовая речь появилась на четвертом году жизни. Основной фенотипической особенностью на момент исследования являлась умственная отсталость легкой степени. Выявлены диспластическое телосложение, диффузная гипермобильность суставов, покатые плечи, узкая грудная клетка, гипотелоризм сосков, латерализация лопаток, грудной кифоз, поясничный гиперлордоз, крупные кисти и стопы, диспластичные, мягкие ногтевые пластины. Особенности строения лица: доминирование лобных отделов, длинная спинка носа, ямка на кончике носа, длинный фильтр, большой рот, маленький подбородок. На коже туловища несколько гипопигментных пятен, одно пятно цвета «кофе с молоком» на голени. В неврологическом статусе стволовые симптомы — глазодвигательные нарушения, гиперсаливация и псевдобульбарная дизартрия. Диффузная умеренная мышечная гипотония и повышенные коленные рефлексы. Положительная проба Ромберга. Мелокинетическая диспраксия. Тикоидные мимические гиперкинезы. Эпилептиформная активность на ЭЭГ. Со стороны эндокринной системы — гипотиреоз.

В результате стандартного цитогенетического исследования хромосом ребенка выявлено уменьшение размера короткого плеча хромосомы 4 (рис. 1). Причиной выявленной аномалии могла быть либо несбалансированная транслокация (возникшая *de novo* или унаследованная от родителей), либо возникшая *de novo* интерстициальная делеция. На основании анализа GTG-окрашенных хромосом кариотип пациентки был описан как 46,XX,der(4)t(4;?)(p12;?) or del(4)(p12p15.2).

Для уточнения диагноза было рекомендовано кариотипирование родителей. Они от обследования отказались. Было выполнено молекулярно-цитогенетическое исследование, включающее двухцветную супрессионную гибридизацию *in situ* микродиссекционных, плечеспецифичных ДНК-проб, специфичных короткому (PCP4p) и длинному (PCP4q) плечам хромосомы 4 (рис. 2) с хромосомами пациентки. Гибридизация PCP4p полностью окрасила p-плечи хромосом 4 и der(4), гибридизация PCP4q окрасила q-плечи этих хромосом. Сигнал на других хромосомах отсутствовал.

Район хромосомы der(4), окрашенный PCP4p, по размеру значительно уступал короткому плечу нормальной хромосомы 4. Результаты проведенного исследова-

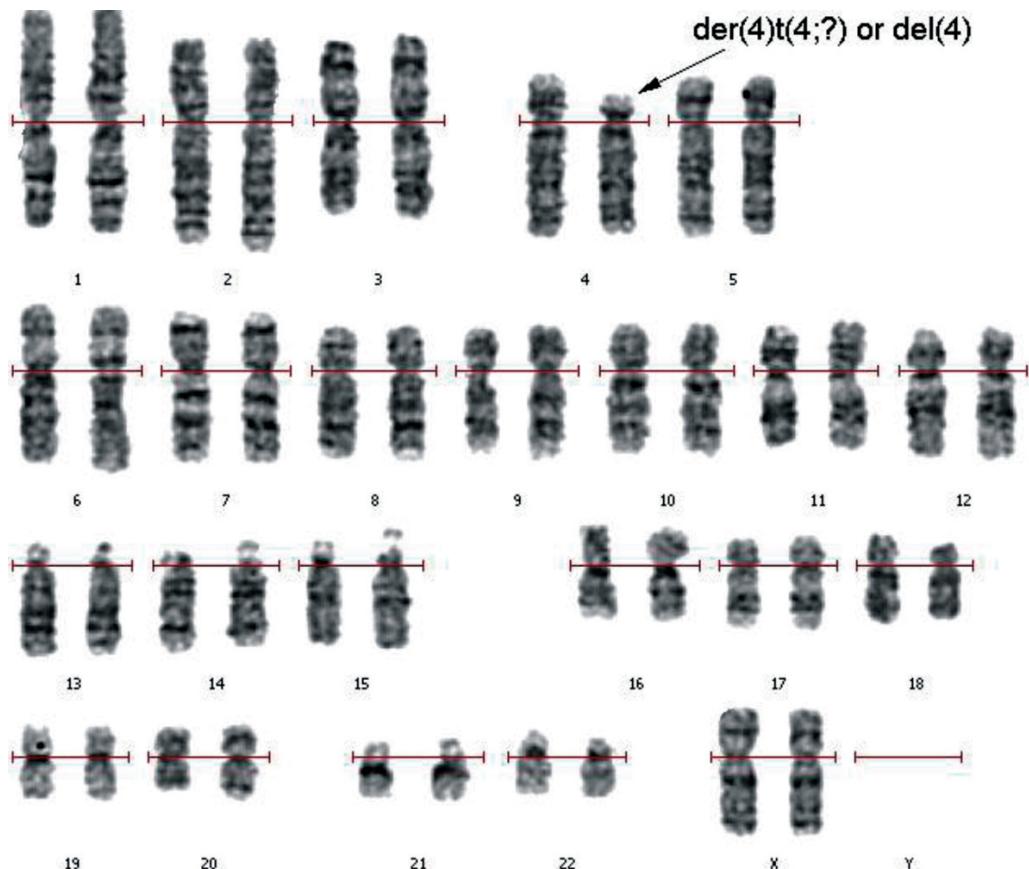


Рис. 1. Случай частичной моносомии короткого плеча хромосомы 4. Кариограмма, G-окрашивание.

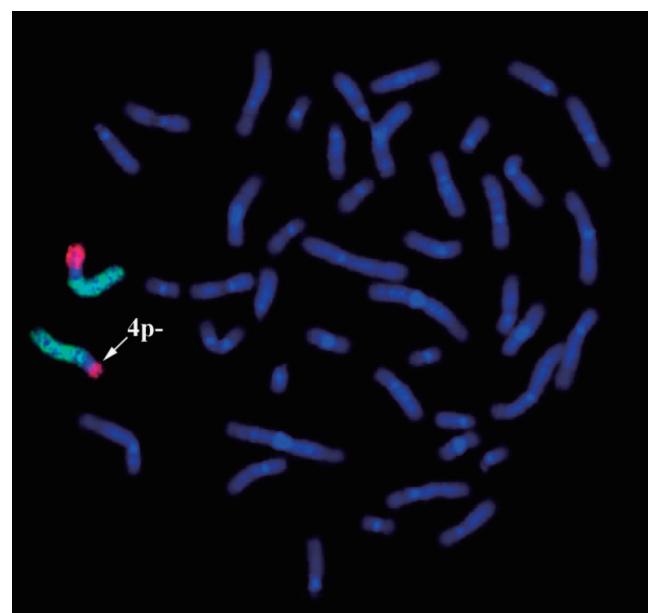


Рис. 2. Супрессионная FISH плечеспецифичных ДНК-зондов на метафазные хромосомы пациента. Сигнал FISH 4p ДНК-зонда красного цвета; сигнал FISH 4q ДНК-зонда зеленого цвета. Общее окрашивание хромосом красителем DAPI (сигнал синего цвета).

ния позволили полностью исключить наличие перицентрической инверсии в хромосоме der(4), сбалансированную транслокацию с вовлечением материала хромосомы 4. Также минимизирована вероятность несбалансированной транслокации с формированием der(4)t(4;?). Теоретически можно допустить присутствие в der(4) очень небольшого района из другой хромосомы, который замаскирован сигналом ДНК-пробы PCP4p. На основании совокупности полученных данных был сделан вывод о наличии интерстициальной делеции в коротком плече одного из гомологов хромосомы 4, и кариотип пациентки был описан как 46,XX,del(4)(p12p15.2).

Таким образом, у девочки имеется частичная моносомия короткого плеча хромосомы 4. В исследованиях, посвященных структурным аномалиям, затрагивающим короткое плечо хромосомы 4, наибольший удельный вес занимают del(4)(p16.3), ассоциированные с синдромом Вольфа—Хиршхорна. Для него характерны резкая задержка психомоторного и психического развития, макроцефалия, гипертelorизм, клювовидный нос, микрогения, деформированные ушные раковины с преарикулярными складками, гипотония мышц, судороги. Довольно часто расщелины верхней губы и неба, деформации стоп, эпикант, неправильной формы углубления в области крестца [10]. Критический район для развития

данного синдрома — 4p16 [11], который в нашем случае сохранен. Видимо поэтому клинические проявления у ребенка во многом отличаются от описанных для синдрома Вольфа—Хиршхорна. В нашем случае была верифицирована интерстициальная делеция (4)(p12p15.2). Из расположенных в этом регионе генов наиболее изученными являются фенотипические эффекты гена *PHOX2B*, дисфункция которого в большинстве случаев приводит к фенотипу CCHS (врожденный центральный синдром гиповентиляции или синдром проклятия Ундины, OMIM 209880). В 16% случаев он сочетается с синдромом Гиршпрунга. Наиболее распространенным типом аномалии является экспансия полиаланинового тракта, реже точковые мутации. Ген *PHOX2B* локализован в 4p12. Частота CCHS — 1:50—200 тыс. новорожденных. Подавляющее большинство случаев — это новые мутации [12]. Для CCHS также характерны стволовые нарушения, включая синдром гиповентиляции. В нашем случае синдрома гиповентиляции не наблюдалось так же, как и синдрома Гиршпрунга.

В работе, посвященной изучению особенностей строения лица у 45 индивидуумов с CCHS [13], имеются краткие описания 3 случаев делеций, затрагивающих этот регион и не укладывающихся в типичную морфологическую картину синдрома. Эти три случая с перестройками в (4)(p11p15) в области гена *PHOX2B* не имели признаков альвеолярной недостаточности. Сделано предположение, что удаление гена *PHOX2B* не приводит к фенотипу CCHS, подтверждая таким образом гипотезу доминирующего отрицательного механизма действия *PHOX2B*-мутаций при CCHS, а не гаплонедостаточности. Следует отметить, что при сравнении черт лица в этих трех случаях с основной группой, разница представлялась авторам не вполне очевидной. В частности, при транслокации, сопоставимой с делецией (4)(p12p13), имелись болезнь Гиршпрунга, микроцефалия, преобладание лицевого черепа, выступающий лоб, очень короткий нос с легкой антеверсией ноздрей, высокая спинка носа, видные границы фильтра и двусторонний эпикант. В случае с делецией (4)(p11p15.2) выявлялись микроцефалия, узкое лицо, короткие глазные щели, птоз, видный носовой мостик, длинный нос и небольшие треугольные уши. При делеции (4)(p12p15) отмечались уплощение левой половины черепа, антимонголоидный разрез глаз и эпикант, деформированные уши с широкими нерегулярно уплощенными завитками, широкий корень носа, асимметрия формы носа и локализации носовой перегородки. Различия между этими описаниями и основной группой, возможно, связаны с тем, что при обширных делециях, затрагивающих другие гены, эффекты их гаплонедостаточности скрыли влияние гена *PHOX2B* на фенотип лица [13].

В 2014 г. японские исследователи описали двухлетнюю девочку с проксимальным 4р-делеционным синдромом и инфантильной эпилептической энцефалопатией, ассоциированными со сбалансированной транс-

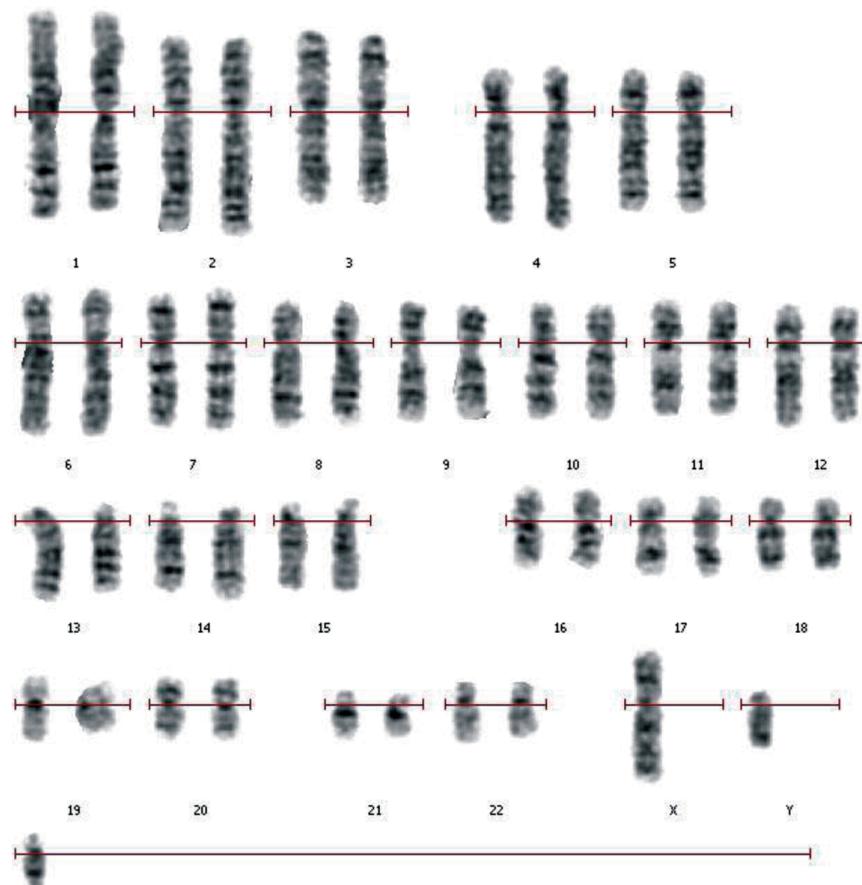
локацией *de novo* t(4;13)(p15.2;q12.13). Пациентке был поставлен диагноз «инфантильные спазмы» в возрасте 9 месяцев. У нее были лицевые дизморфии и задержка развития [14]. Как отмечают авторы, сообщалось более чем о 20 случаях проксимального синдрома делеции 4р, но гены, поражение которых приводит к нему, остаются не идентифицированным.

Описание еще одного случая, со схожим с нашей пациенткой фенотипом, представлено в Датской базе данных. Это 38-летняя женщина с интерстициальной делецией (4)(p15.1p15.3), легкой умственной отсталостью, эпилепсией и полимиокризией, примыкающей к паутинной оболочке кисте левой височной доли. Делеция была установлена методом сравнительного геном-гибридизационного скрининга пациентов с эпилепсией и пороками развития головного мозга [15].

Ген *PNOX2B* кодирует высококонсервативный фактор транскрипции гомеобоксного домена с ранним эмбриологическим действием в качестве активатора транскрипции в продвижении паннейрональной дифференцировки, а также он подавляет экспрессию ингибиторов нейрогенеза. Нарушения этого механизма приводят к «нейрокристопатии», то есть болезнь связана с дефектами нервного гребня, которые могут влиять на формирование специфических лицевых структур и приводить к стволовым неврологическим нарушениям. Возможно, что различные варианты поражений региона (4)(p11p15) порождают спектр фенотипов, общим для которых является не столько специфичность лица, а, в большей степени, нарушение стволовой дифференцировки.

**Случай 2.** Двухлетний мальчик с предварительным диагнозом «расщелина мягкого неба», которому при кардиотипировании в одной из лабораторий на Дальнем Востоке был поставлен диагноз «трисомия хромосомы 22». Ребенок от второй беременности (в семье есть здоровая девочка). При рождении отмечалась задержка внутриутробного развития по гипопластическому типу. Мальчик наблюдался у невролога с диагнозом: *церебральная ишемия 2 степени, синдром двигательных, вегето-висцеральных дисфункций*. Отмечается задержка психомоторного развития: удержание головы с 7 мес., сидеть стал с 1 года, на момент осмотра (2 года) ходит с 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 син-



inv dup (13 or 14 or 15 or 21 or 22)

Рис. 3. Случай выявления МХ. Кариограмма, G-окрашивание.

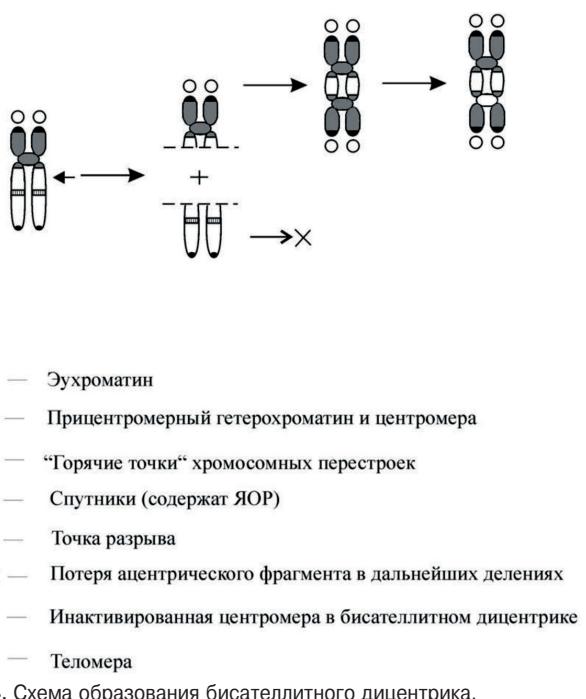


Рис. 4. Схема образования бисателлитного дицентрика.

дактилия 2–3 пальцев стоп. Двусторонний крипторхизм. Расщелина 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 (синдром «кошачьего глаза»). В частности, у ребенка не наблюдалась колобома радужки и атрезия ануса, характерные для данного синдрома [10]. 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 направил мальчика на повторное кариотипирование.

При повторном исследовании в цитогенетической лаборатории Центра персонализированной медицины (г. Новосибирск) дополнительная хромосома была охарактеризована как малая сверхчисленная МХ, имитирующая хромосому 22 (рис. 3).

Около 80% малых сверхчисленных МХ человека происходят из акроцентрических хромосом. Их основная часть представляет производные хромосомы 15 (около 60%) [16]. Они были найдены как у фенотипиче-

ски нормальных пациентов, так и у пациентов с задержкой умственного развития. Часто в их состав входят две копии коротких плеч хромосомы 15, находящихся в инвертированной ориентации: inv dup(15). Формирование МХ связано с разрывами хромосом и их ошибочной reparацией (рис. 4). В случае акроцентрических хромосом в результате разрыва и дупликации формируется изохромосома, содержащая две копии короткого плеча, центромерного района и участка хромосомы между центромерным районом и точкой разрыва. Одна из центромер такой маркерной хромосомы инактивируется. В зависимости от локализации точки разрыва МХ может содержать различные эухроматиновые сегменты исходной хромосомы [17].

Большинство МХ, ассоциированных с врожденными пороками развития и умственной отсталостью, характеризуются наличием эухроматиновых сегментов [18]. Конкретное содержание таких сегментов в МХ и определяет их клиническое значение. Поэтому детекция эухроматиновых сегментов в МХ и идентификация их материала является важной 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. 5а), Ag-NOR-окрашивание —

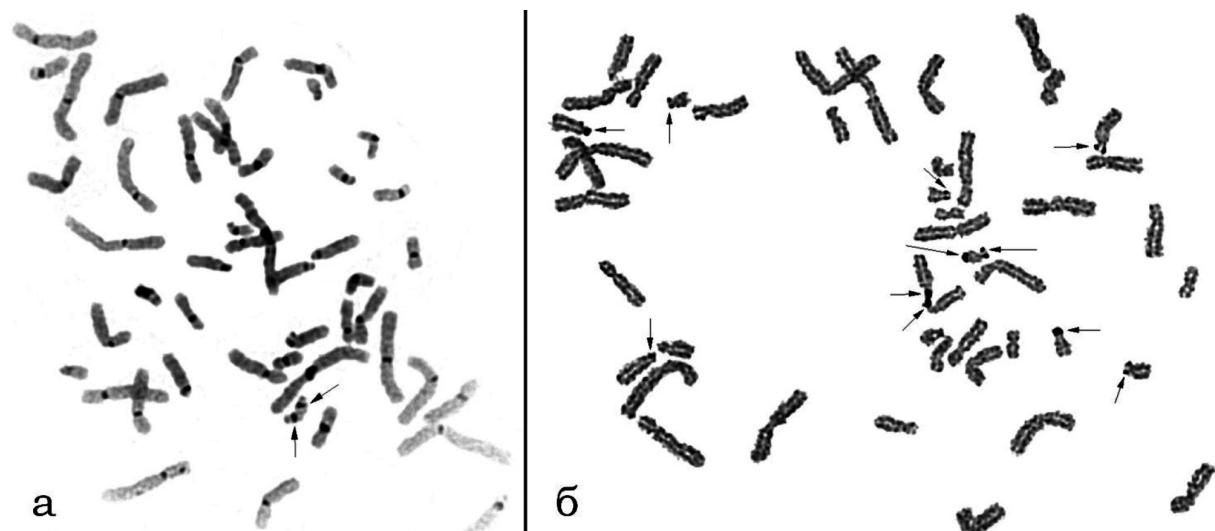


Рис. 5. Случай выявления МХ.

а) С-окрашивание. Стрелки указывают на гетерохроматиновые районы в обоих плечах МХ.  
б) Серебрение. Длинные стрелки указывают на районы ядрышковых организаторов в обоих плечах МХ. Короткие стрелки указывают на районы ядрышковых организаторов других акроцентрических хромосом.

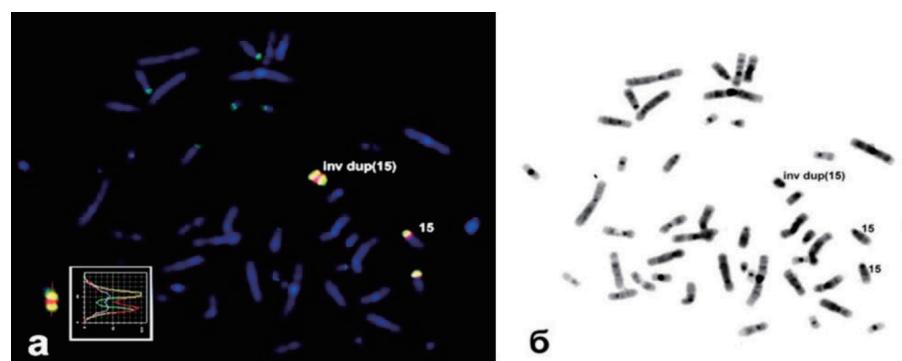
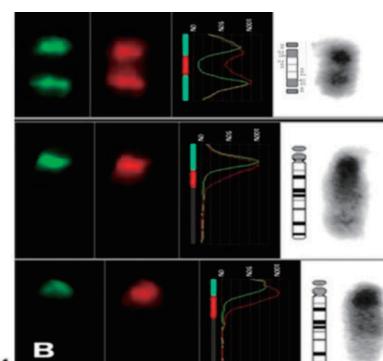


Рис. 6. Молекулярная диагностика для выявления происхождения и состава МХ.

а) Двухцветная FISH районаспецифичных ДНК-проб, полученных из охарактеризованных ранее МХ inv dup(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. inv dup (15) — указывает на МХ. 15 — нормальные гомологи хромосомы 15. Слева, внизу представлены профили интенсивностей двух FISH сигналов по длине МХ пациента.

б) Инвертированный DAPI бэндинг.

в) Профили интенсивностей сигналов на МХ inv dup(15) и гомологах хромосомы 15.



районы ядрышковых организаторов на обоих плечах МХ (рис. 5б).

Определить точное происхождение МХ вследствие ее малого размера классическими цитогенетическими методами невозможно, но эти методы позволили сузить круг поиска исходной хромосомы до пяти акроцентрических хромосом. Кариотип ребенка был описан как 47,XY,+inv dup(13 or 14 or 15 or 21 or 22). Результаты супрессионной гибридизации *in situ* микродиссекционных ДНК-проб, приготовленных из двух ранее охарактеризованных маркерных хромосом inv dup(15)(q11) и inv dup(15)(q13) (рис. 6 а—в), позволили описать МХ как inv dup(15)(q13). ДНК-проба, приготовленная из inv dup(15)(q11), окрашивала район 15(pter→q11), т.е. короткое плечо и С-позитивный прицентромерный район хромосомы 15. ДНК-проба, приготовленная из inv dup(15)(q13), окрашивала район 15(pter→q13). Таким образом, район хромосомы, в котором выявляется сигнал только ДНК-пробы из inv dup(15)(q13), соответствует эухроматиновому району 15(q12→q13).

В результате проведенных исследований сигнал ДНК-пробы inv dup(15)(q11) был выявлен в районе 15(pter→q11) и в дистальных районах МХ пациента (зеленый сигнал), а сигнал ДНК-пробы inv dup(15)(q13) был выявлен в районе 15(pter→q13) и на всей МХ пациента (красный сигнал). Таким образом, часть МХ была окрашена только ДНК-пробой, полученной из inv dup(15)(q13), что указывает на наличие в ее составе района 15(q12→q13). Полученные результаты позволили сделать заключение о происхождении МХ из хромосомы 15. МХ представляет собой inv dup(15)(q13), кариотип пациента был описан как 47,XY,+inv dup(15)(q13).

Ранее было показано, что присутствие inv dup(15)(q13) в клетках пациентов связано с развитием синдрома inv dup(15): задержка умственного и общего развития, гипотония, нарушение поведенческих реакций, эпилептические припадки, аномальная дерматоглифика, соматические нарушения [19]. Клинические проявления у пациента, в основном, соответствуют описанным в литературе.

Одним из важных вопросов, встающих перед исследователем при проведении цитогенетической и молекулярно-цитогенетической диагностики, является вопрос достаточности проведенной диагностики. В конкретных случаях он касается дальнейшего уточнения локализации точки разрыва. Более точно локализация точек разрыва при хромосомных перестройках может быть определена при полногеномном секвенировании или сравнительной геномной гибридизации на соответствующих микрочипах. К сожалению, такое уточнение может не дать врачу-генетику дополнительной полезной информации для проведения консультирования пациента или его родителей. Проблема может заключаться не только в отсутствии информации о последствии такой хромосомной перестройки, но также и в различном ее проведении на разном генетическом фоне. Т.е., в подобных

случаях пациент оказывается незaintересованным в проведении уточняющей диагностики. Заинтересованной стороной в этом случае оказывается сообщество генетиков, так как получение информации, включающей точную локализацию точек разрыва при формировании хромосомных перестроек и полное описание генома пациента, полученное при полногеномном секвенировании, в будущем позволит получить базу данных, дающую возможность перейти на принципиально новый, более высокий уровень медико-генетического консультирования.

Следует отметить, что подход к вопросу о необходимости продолжения диагностики и уточнения локализации точек разрыва должен быть строго индивидуальным. Уже сегодня переход в локализации точки разрыва с бэнда или суббэнда хромосомы на последовательности ДНК в сиквенсе генома человека, может иметь принципиальное значение. Примером такой перестройки может служить делеция дистального района короткого плеча хромосомы 3. Проявление делеции 3pter→p25 варьирует от серьезных аномалий развития до близкого к нормальному фенотипу [20] в зависимости от локализации точки разрыва в 3р25. В этом и подобных ему случаях необходимо проведение исследований, уточняющих локализацию точки разрыва.

### Список литературы

1. Захаров АФ, Бенюш ВА, Кулешов НП, Барановская ЛИ. Хромосомы человека (атлас). М.: Медицина. 1982; 263 с.
2. Goodpasture C, Bloom SE Visualization of nucleolar organizer regions. III. Mammalian chromosomes using silver staining. Chromosoma. 1975;53:37-50.
3. Баранов ВС, Кузнецова ТВ. Цитогенетика эмбрионального развития. СПб: Издательство Н-Л. 2007; 640 с.
4. Henegariu O, Heerema N, Wright I, Bray-Ward P et al. Improvements in cytogenetic slide preparation: controlled chromosome spreading, chemical aging and gradual denaturing. Cytometry. 2001;43:101-109.
5. Rubtsov N, Karamysheva T, Babochkina T et. al. 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. MedGen. 2000;12:65.
6. Карамышева ТВ, Матвеева ВГ, Шорина АР, Рубцов НБ. Клинический и молекулярно-цитогенетический анализ редкого случая мозаичизма по частичной моносомии 3р и частичной тризомии 10q у человека. Генетика. 2001;37(3):1-6.
7. Telenius H, Carter NP, Bebb CE. Degenerate oligonucleotide-primer PCR: general amplification of target DNA by single degenerate primer. Genomics. 1992;13:718-725.
8. Lichter P, Cremer T, Borden J, Manuelidis L, Ward DC. De-lineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by *in situ* suppression hybridization using recombinant DNA libraries. Hum Genet. 1988;80:224-234.
9. Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ, editors. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature: Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. Basel, Switzerland: Karger. 2009.
10. Ворсанова СГ, Юров ЮБ, Чернышов ВН. Медицинская цитогенетика. М: «Медпрактика-М». 2006;300 с.

11. Wilson MG, Towner JW, Coffin GS et al. Genetic and clinical studies in 13 patients with the Wolf-Hirschhorn syndrome del(4p). *Hum. Genet.* 1981;59:297-307.
12. Central Hypoventilation Syndrome — Patient and Carer Information Booklet — edited by the EUCHS Consortium — 1st edition 2012.
13. Todd ES, Weinberg SM, Berry-Kravis EM et al. Facial Phenotype in Children and Young Adults with PHOX2B-Determined Congenital Central Hypoventilation Syndrome: Quantitative Pattern of Dys-morphology. *Pediatric Research.* 2006;59:39-45.
14. Nakayama T, Saitsu H, Endo W et al. RBPJ is disrupted in a case of proximal 4p deletion syndrome with epilepsy. *Brain. Dev.* 2014 Jun;36(6):532-536.
15. Moller RS, Hansen CP, Jackson GD et al. Interstitial deletion of chromosome 4p associated with mild mental retardation, epilepsy and polymicrogyria of the left temporal lobe. *Clinical Genetics.* 2007;72(6):593-598.
16. Blennow E, Bui TH, Kristoffersson U et al. Swedish survey on extra structurally abnormal chromosomes in 39105 consecutive prenatal diagnoses: prevalence and characterization by fluorescence *in situ* hybridization. *Prenat. Diagn.* 1994;14(11):1019-1028.
17. Рубцов НБ, Карамышева ТВ, Гайнер ТА, Шкляева ОА. Анализ маркерных хромосом: ДНК пробы для оценки возможного клинического значения маркерной хромосомы. *Медицинская генетика.* 2003;2(12):520-527.
18. Wandstrat AE, Schwartz S. Isolation and molecular analysis of inv dup(15) and construction of a physical map of a common breakpoint in order to elucidate their mechanism of formation. *Chromosoma.* 2000;109(7):498-505.
19. Webb T, Hardy CA, King MA et al. A clinical, cytogenetic and molecular study of ten probands with supernumerary inv dup(15) marker chromosomes. *Clin. Genet.* 1998; 53(1):34-43.
20. Kariya S, Aojo K, Akagi H et al. A terminal deletion of the short arm of chromosome 3: karyotype 46, XY, del (3) (p25-pter); a case report and literature review. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2000;56(1):71-8.