

Интерпретация фенотипа пациента с учетом результатов комплексных молекулярно-цитогенетических исследований

Кашеварова А.А.^{1*}, Беляева Е.О.¹, Никонов А.М.², Плотникова О.В.², Гергерт И.Г.³,
Никитина Т.В.¹, Скрябин Н.А.¹, Васильев С.А.¹, Лопаткина М.Е.¹, Чурилова А.В.⁴,
Толмачева Е.Н.¹, Назаренко Л.П.¹, Лебедев И.Н.¹

¹ Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, Томск

² Краевое государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Диагностический центр Алтайского края», Барнаул

³ Алтайский Краевой Клинический Перинатальный центр «Дар», Барнаул

⁴ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск

*e-mail: anna.kashevarova@medgenetics.ru

Актуальность: Врожденные и наследственные болезни в значительной мере представлены хромосомной патологией. В связи с этим ранняя диагностика, своевременно начатое лечение и реабилитация, профилактика возникновения и распространения этих заболеваний имеют особое значение. **Цель:** Используя комбинацию молекулярно-цитогенетических методов, литературные данные и исследуя несколько типов клеток, выявить генетические причины заболевания у пациента. **Материалы и методы:** У пробанда взяты лимфоциты периферической крови и фибробласты кожи. Исследование проведено путем метафазного анализа, матричной сравнительной геномной гибридизации (aCGH) на микрочипах 8x60K (Agilent Technologies), ПЦР в реальном времени и флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH). **Результаты:** У пациента с цитогенетически визуализируемой кольцевой хромосомой 13 — r(13) — выявлены симптомы, не ассоциированные с данной хромосомной аномалией. Кроме терминальной делеции 13q34, обусловившей r(13), идентифицирована трипликация 3q12. В фибробластах в ходе микрочипового исследования дополнительно обнаружена моносомия 13. Методом FISH-анализа установлено, что доля лимфоцитов и фибробластов с моносомией по хромосоме 13 составила 47% и 50% соответственно. **Выводы:** В случае хромосомной патологии объяснить все симптомы пациента, дать объективный прогноз заболевания и предложить лечение позволяет комплексный подход, включающий в себя применение адекватных методов исследования, анализ нескольких тканей в сложных случаях, работу с литературными данными и базами и взаимодействие врачей и специалистов разного профиля.

Ключевые слова: метафазный анализ, флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH), матричная сравнительная геномная гибридизация (aCGH), кольцевая хромосома, моносомия, делеция, трипликация.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Экспериментальная часть исследования выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-15-10231. Клиническое обследование пациентов проведено в рамках темы поисковых научных исследований «Разработка алгоритма молекулярно-цитогенетической диагностики кольцевых хромосом у пациентов с множественными врожденными пороками развития и задержкой интеллектуального развития» государственного задания ФАНО РФ для НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

Interpretation of a patient's phenotype using a complex of molecular cytogenetic methods

Kashevarova A.A.^{1*}, Belyaeva E.O.¹, Nikonov A.M.², Plotnikova O.V.³, Gergert I.G.³,
Nikitina T.V.¹, Skryabin N.A.¹, Vasilyev S.A.¹, Lopatkina M.E.¹, Churilova A.V.⁴,
Tolmacheva E.N.¹, Nazarenko L.P.¹, Lebedev I.N.¹

¹ Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk

² Diagnostic Center of the Altai Region, Barnaul

³ Altai Regional Clinical Perinatal Center «Dar», Barnaul

⁴ Tomsk State University, Tomsk

* e-mail: anna.kashevarova@medgenetics.ru

Introduction: Congenital and hereditary diseases are largely represented by chromosomal pathology. In this regard, early diagnosis, treatment, rehabilitation, prevention of the origin and distribution of these diseases are of particular importance. **Aim:** Using a combination of cytogenetic methods, literature data and investigating several types of cells, to find out the genetic causes of disease in the patient. **Materials and methods:** Peripheral blood lymphocytes and skin fibroblasts were obtained from the proband. The study was performed using metaphase analysis, array comparative genomic hybridization (aCGH) on 8x60K microarrays (Agilent Technologies), real-time PCR and fluorescent *in situ* hybridization (FISH). **Results:** The patient with r(13) had several symptoms not associated with this chromosomal abnormality. In addition to the terminal del13q34, which caused the formation of r(13), trip3q12 was identified. In fibroblasts monosomy 13 was additionally detected during aCGH-analysis. Using FISH-analysis 47% and 50% of cell with monosomy 13 were detected among lymphocytes and fibroblasts, respectively. **Conclusion:** In the case of a chromosomal pathology a complex approach, involving the application of adequate research methods, analysis of several tissues in complex cases, work with

literature and databases, and interaction of physicians and specialists of different profiles, will allow to explain the patient's symptoms, provide an objective prognosis of the disease, and propose treatment.

Key words: metaphase analysis, fluorescent in situ hybridization (FISH), array comparative genomic hybridization (aCGH), ring chromosome, monosomy, deletion, triplication.

Хромосомные мутации являются ведущей причиной генетических заболеваний. Стандартным исследованием для пациентов с задержкой развития, врожденными аномалиями, бесплодием и привычным невынашиванием является метафазный анализ. Ограничения данного метода связаны с невозможностью выявления мелких хромосомных перестроек, культивированием клеток, исследованием только лимфоцитов. Методы молекулярной цитогенетики (FISH, aCGH, NGS) значительно улучшили диагностику причин перечисленных выше патологий. Появилась возможность обнаружения субмикроскопических аномалий, определения точек разрывов при хромосомных мутациях, идентификации маркерных хромосом, определения хромосомного состава сложных перестроек, оценки уровня мозаицизма. Но даже при всех этих плюсах исследование только лимфоцитов не всегда позволяет поставить точный диагноз. В ряде случаев требуется анализ других тканей: фибробластов кожи, буккального эпителия. Точная диагностика хромосомных аномалий чрезвычайно важна для клинического ведения пациента, прогноза заболевания, определения повторных рисков.

В данной работе описан пациент с интеллектуальными нарушениями (ИН) и выявленными у него кольцевой хромосомой 13 (метафазный анализ), trip3q12.2 и del13q34 (aCGH), моносомией 13 в 47% лимфоцитов и 50% фибробластов (FISH).

Клинический случай

Пациент Г. 17 лет. Вес при рождении 3600 г (50 процентиль), рост 52 см (75 процентиль), окружность головы 35 см (25 процентиль). Ребенок от второй беременности, первых родов. Первая беременность закончилась выкидышем. Данная беременность сопровождалась повышенным тонусом матки и угрозой прерывания. Нервно-психическое и физическое развитие до 2,5 лет соответственно возрасту, далее с прогрессированием задержки развития и ускоренными прибавками в весе.

В 10 лет пробанд впервые обследован эндокринологом. Диагноз — гипергонадотропный гипогонадизм. УЗИ органов мошонки: уменьшение размеров и диффузные изменения эхоструктуры обоих яичек. УЗИ органов брюшной полости: деформация желчного пузыря, диффузные изменения стенок сосудов печени, диффузно-неоднородные изменения в паренхиме поджелудочной железы, ротация по длиннику левой почки. УЗИ щитовидной железы: диффузно-неоднородные изменения эхоструктуры. Дополнительно выявлены аномально расположенная хорда в сердце и синусовая тахикардия.

В 11 лет диагностирован тревожно-фобический синдром.

В настоящее время в связи с задержкой полового развития состоит на учете у эндокринолога и андролога с диагнозом *гипоталамический синдром пубертатного периода на фоне резидуально-органического заболевания головного мозга с задержкой полового развития, средняя степень тяжести, перманентное течение; ожирение второй степени*. На момент осмотра (17 лет) вес 93 кг (97 процентиль), рост 178 см (50—75 процентиль), окружность головы 58 см (98 процентиль). При осмотре отмечены глубоко посаженные глаза, изогнутая верхняя губа, аномальный рост волос на макушке, волосы жесткие, светлые, избыточный рост волос на предплечьях, микроорхидизм, сандалевидная щель стопы.

Обследование медицинским психологом (17 лет). Пациент медлителен и молчалив. Коэффициент работоспособности сниженный (2,9 по Шульте). Память снижена (10 слов). Коэффициент по Векслеру 67 (легкий умственный дефект).

По данным психиатра, пробанд имеет конкретное мышление; абстрагирование затруднено. Диагноз: легкая умственная отсталость сложного генеза. Цереб्रोастенический синдром (F70.1).

Материалы и методы

Лимфоциты периферической крови и фибробласты кожи были получены от пробанда с ИН. Методом метафазного анализа у пациента была выявлена г(13). Микрочип Human Genome CGH Microarray Kits 8x60K (Agilent Technologies, США) был использован для полногеномного скрининга и определения делеции на конце длинного плеча хромосомы 13 [1]. Интерпретация CNVs проведена с использованием Базы данных геномных вариантов (DGV) [2] и базы NCBI Gene [3]. Патогенетически значимые CNV подтверждены методом ПЦР в реальном времени, и определено их происхождение.

Структура кольцевой хромосомы и ее частота при культивировании лимфоцитов и фибробластов исследованы FISH-методом с зондами на центромеры хромосом 13/21 (D13Z1/D21Z1) и субтеломерным зондом 13q. Клоны *E.coli*, несущие плазмиды со вставками центромероспецифичных альфа-сателлитных последовательностей ДНК, а также ВАС-клон bA569D на область 13q были любезно предоставлены профессором М.Роччи (Resources for Molecular Cytogenetics, Институт генетики г. Бари, Италия). Зонды 13q и 13/21 помечены TAM-RA-dUTP и Fluorescein-dUTP соответственно (BioSan, Россия).

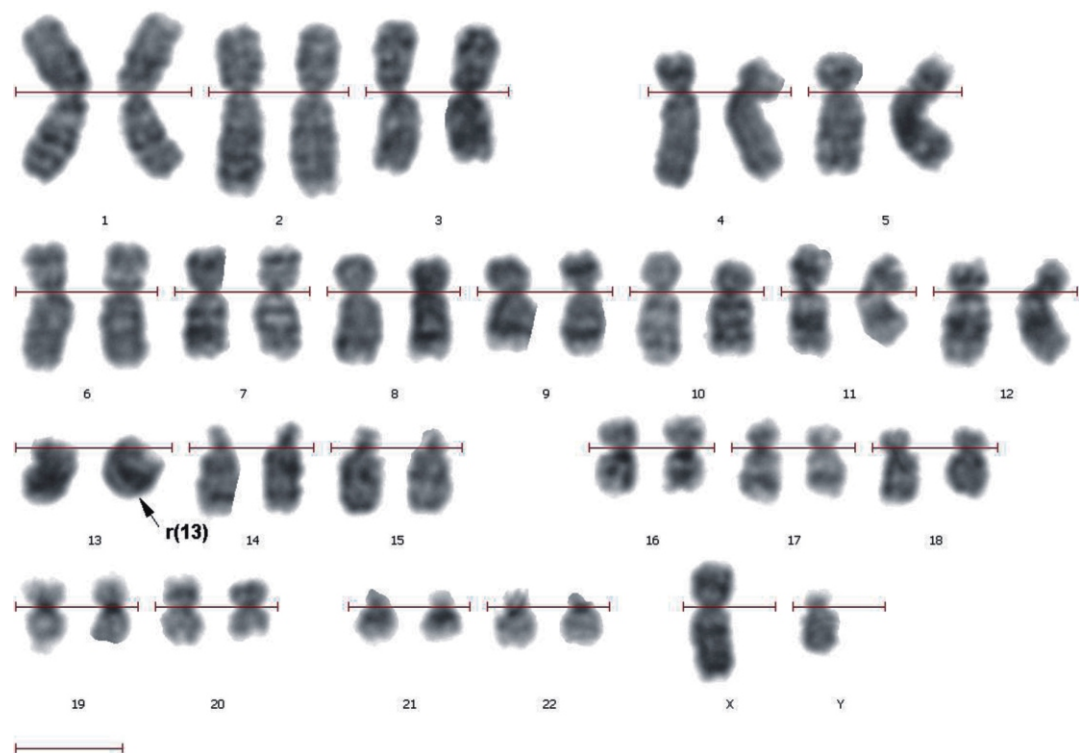


Рис. 1. Кариограмма пациента Г. Стрелкой отмечена кольцевая хромосома 13.

Проведение исследования одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. Информированное согласие от родителей пробанда получено. Исследование выполнено на базе Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ с использованием ресурсов биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии».

Результаты и обсуждение

При проведении метафазного анализа в периферической крови пробанда выявлена кольцевая хромосома 13 (кариотип — 46,XY,r(13)(p13q34)) (рис. 1). Согласно карте терминальных делеций хромосомы 13, делеция у пациента Г. относится к наиболее частой группе I (66% обследованных) с точками разрыва в 13q33-q34 [4]. Симптомы, типичные для группы I, и их сравнение с признаками пациента Г. приведены в таблице.

Таблица

Клинические признаки по [4]	Пациент Г.
Задержка роста (75—100%)	Рост выше среднего
Микроцефалия (75—100%)	Макроцефалия
Интеллектуальные нарушения (75—100%)	Да
Широкая переносица (50—74%)	Нет
Гипертелоризм (25—49%)	Нет
Высокое нёбо (25—49%)	Да
Эпикант (50—74%)	Да
Микрогнатия (25—49%)	Нет
Аномалии ушной раковины (25—49%)	Приросшая мочка
Аномалии половых органов (25—49%)	Да
Аномалии кистей (25—49%)	Нет
Примечание. В скобках указан процент пациентов с r(13), у которых данный признак был отмечен.	

Итак, признаки у пробанда Г. по сравнению с описанными при г(13) можно разделить на две группы: идентичные (ИН, высокое небо, эпикант, присосная мочка уха, аномалии половых органов) и зеркальные (рост выше среднего, макроцефалия). Однако ряд симптомов, характерных для пациентов с г(13,) у пробанда Г. отсутствует, что может быть обусловлено его менее протяженной делецией: в данной группе точки разрывов могут быть локализованы центромнее (13q33-q34), чем у пациента Г. (13q34). Brandt с соавторами у пациентов с точками разрывов в 13q33-q34 дополнительно отмечают аномалии волос (низкая линия роста, алопеция), функциональный дефект почек, аномалии стопы [5]. У пробанда Г. также выявлены аномалии волос, ро-

тация по длиннику левой почки и сандалевидная щель стопы. Дополнительно у нашего пациента при проведении УЗИ обнаружены изменения в желчном пузыре, печени, поджелудочной и щитовидной железах, которые не описаны при делециях 13q34.

Поскольку кольцевая хромосома 13 с делецией в области 13q34 не может в полной мере объяснить симптомы, обнаруженные у пациента Г., нами проведено полногеномное исследование методом аCGH и выявлены микроделеция 13q34 (1,924 млн п.н.) и трипликация 3q12.2 (74 т.п.н.) (рис. 2). Клиническая значимость trip3q12.2 на сегодняшний день не ясна. Она выявляется как у здоровых людей, так и у онкологических больных [6]. Данная трипликация приводит к образованию хи-

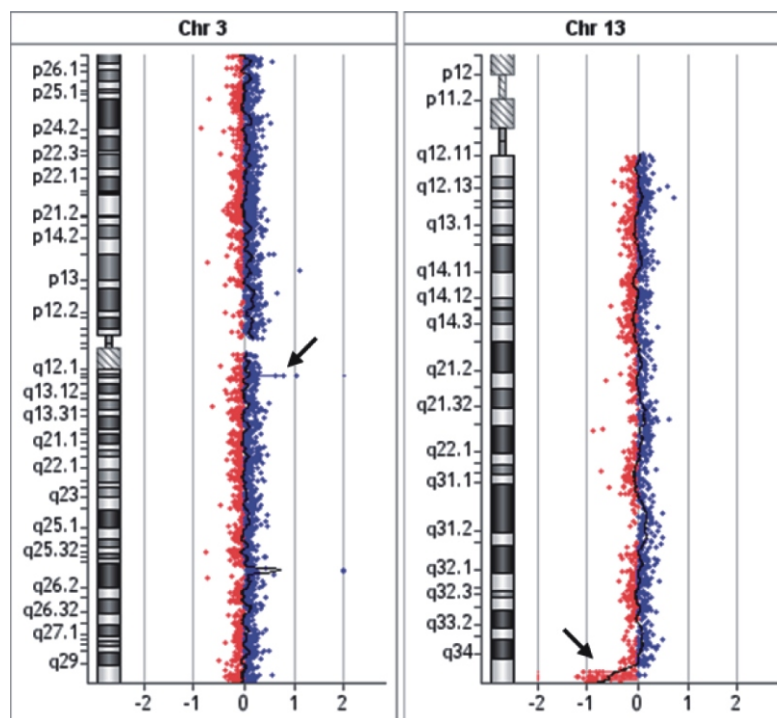


Рис. 2. аCGH профили хромосом 3 и 13 в лимфоцитах пациента Г. Стрелками отмечены trip3q12.2 и del13q34.

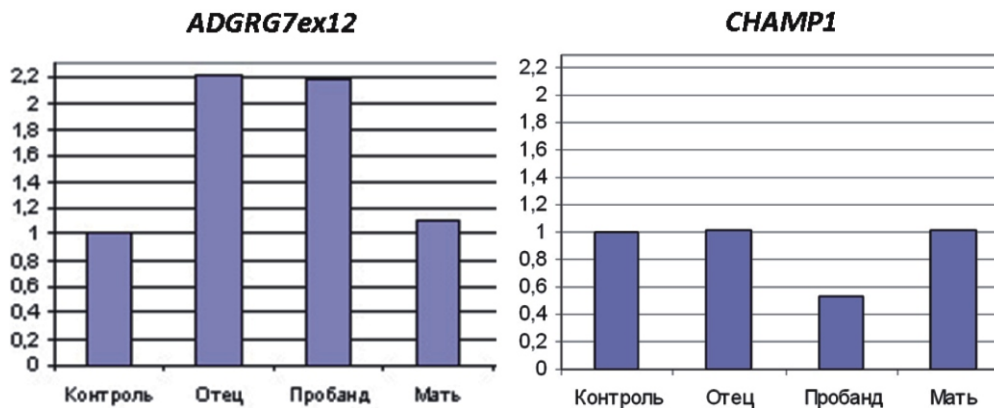


Рис. 3. Результаты ПЦР в реальном времени для семьи пациента Г. с праймерами на гены *ADGRG7ex12* (trip3q12.1), *CHAMP1* (del13q34).

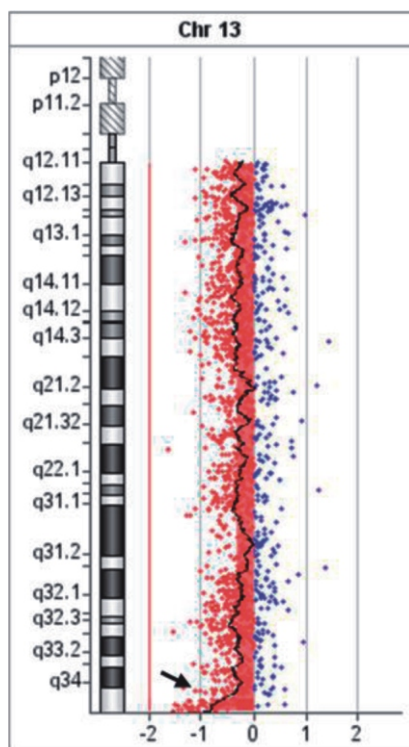


Рис. 4. aCGH профиль, демонстрирующий моносомию хромосомы 13 в фибробластах кожи пациента Г. Стрелкой отмечена del13q34.

мерного транскрипта TFG-GPR128. Мутации в гене *TFG* (OMIM 602498) ассоциированы с нарушением белковых секреторных путей и функций периферической нервной системы. Методом ПЦР в реальном времени показано, что микроделеция возникла *de novo*, а трипликация имеет отцовское происхождение (рис. 3).

Кроме того, в исследование был включен дополнительный тип клеток — фибробласты кожи. В культуре фибробластов aCGH также выявил микроделецию 13q34 (2,099 млн п.н.), но еще и моносомию 13 (рис. 4). Методом FISH подтверждено наличие r(13) и обнаружено, что 50% фибробластов (66 из 132 клеток) моносомны по хромосоме 13 (рис. 5). Моносомия 13 нами была также выявлена в 47% культивированных лимфоцитов (80 из 170 клеток). Судя по высокому проценту моносомного клона, можно предположить, что потеря кольца произошла довольно давно, что привело к дальнейшей пролиферации двух клонов — дисомного и моносомного. Тот факт, что моносомный клон в лимфоцитах был обнаружен только методом FISH-анализа, может быть обусловлен тем, что в культуре преимущественно пролиферировал именно тот тип клеток крови, который содержал r(13) и моносомию 13. В то время как для микрочипового исследования ДНК была выделена из всей клеточной массы и чувствительность метода не позволила зарегистрировать моносомию.

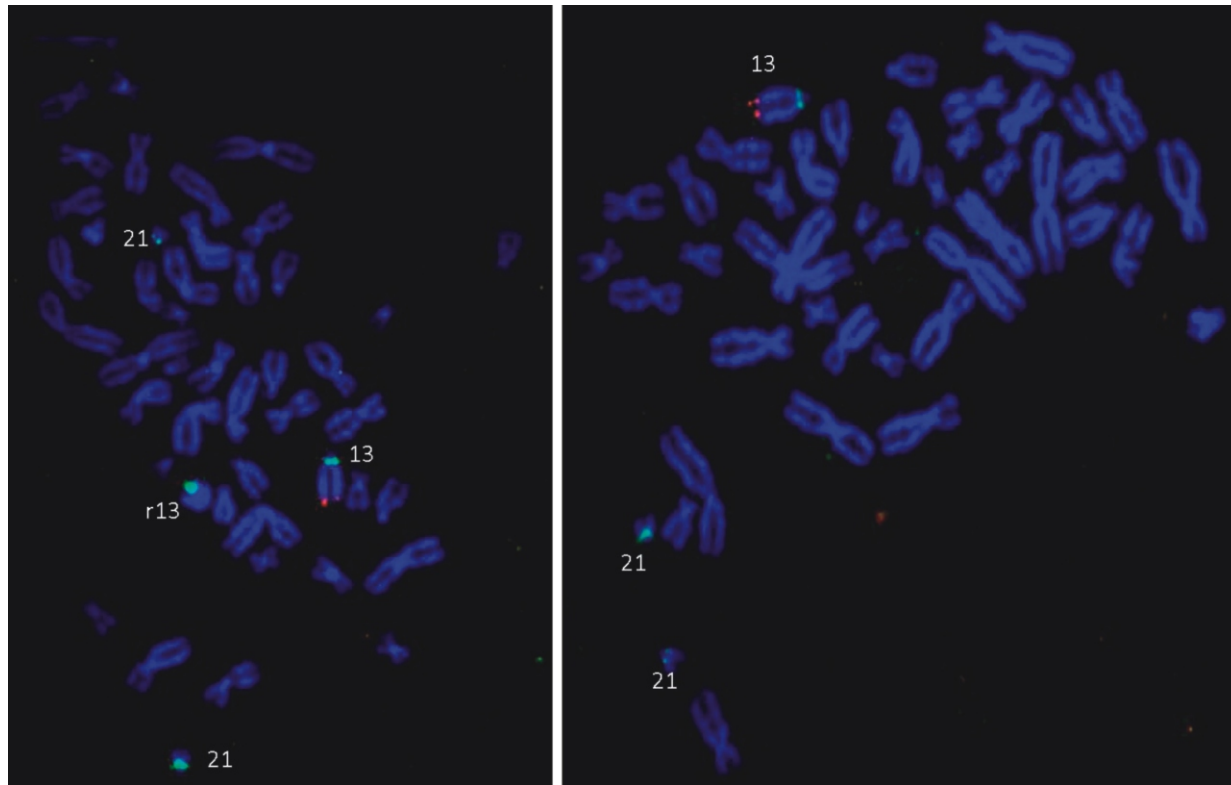


Рис. 5. FISH-анализ фибробластов кожи пациента Г. Кольцевая хромосома 13 (слева) и моносомия 13 (справа). Использованы центромероспецифичный зонд D13Z1/D21Z1 (зеленый) и субтеломерный зонд 13q (красный).

Итак, каждый пациент с генетическим заболеванием требует индивидуального подхода, неоднократного приема у врача-генетика и тщательного обследования. Рассмотренный в статье пример наглядно демонстрирует необходимость подробного анализа литературных данных и сопоставления симптомов, обнаруженных у пациента и описанных в литературе. Выявленные несоответствия могут быть обусловлены не только клиническим полиморфизмом заболевания, но и наличием дополнительных генетических аномалий, которые могут быть идентифицированы с помощью других методов, кроме общепринятого метафазного анализа, и в других тканях.

Список литературы

1. Протокол aCGH для микрочипов Agilent Technologies — http://www.chem-agilent.com/pdf/G4410-90020v3_1_CGH_ULS_Protocol.pdf
2. База данных геномных вариантов — <http://projects.tcag.ca/variation/?source=hg18>
3. База о генах — <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>
4. Xu F, DiAdamo AJ, Grommisch B, Li P. Interstitial duplication and distal deletion in a ring chromosome 13 with pulmonary atresia and ventricular septal defect: a case report and review of literature. *N A J Med Sci.* 2013; 6(4):208-212.
5. Brandt CA, Hertz JM, Petersen MB et al. Ring chromosome 13: lack of distinct syndromes based on different breakpoints on 13q. *J Med Genet.* 1992; 29:704-708.
6. Izykowska K, Przybylski GK, Gand C et al. Genetic rearrangements result in altered gene expression and novel fusion transcripts in Sezary syndrome. *Oncotarget.* 2017; 8(24):39627-39639.