

Л.В. ТАВОКИНА, С.Г. ВОРСАНОВА, В.Д. ЗУКИН,
Н.И. СОПКО, В.М. ЗИНЧЕНКО, В.В. ВЕСЕЛОВСКИЙ,
А.М. БЫЧКОВА, Т.В. НИКИТЧИНА, Ю.Б. ЮРОВ
ТОВ «ІСІДА-IVF» Україна, 01135, г. Киев, ул. Черновола, 28/1

ОПИСАНИЕ СЛУЧАЯ ДЕЛЕЦИИ КОРОТКОГО ПЛЕЧА ХРОМОСОМЫ 21 (21p-) (CHRISTCHURCH CHROMOSOME), ВЫЯВЛЕННОГО ПРЕНАТАЛЬНО: КЛИНИЧЕСКИЕ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ



Представлены результаты цитогенетического исследования ворсин плаценты и культуры амниоцитов плода 22 нед с множественными врожденными пороками развития (МВПР), выявленными при ультразвуковой диагностике. В кариотипе плода обнаружено отсутствие короткого плеча одного из гомологов хромосомы 21. Аналогичная хромосома выявлена при цитогенетическом исследовании лимфоцитов крови фенотипически нормального отца проба. Дальнейшее исследование кариотипа отца FISH-методом с использованием оригинальных ДНК-проб обнаружило отсутствие субтеломерных районов короткого плеча хромосомы 21, что можно расценивать как делецию. Высказано предположение, что эффект положения генов и их взаимодействие могут играть решающую роль в возникновении МВПР у плода при передаче ему от здоровых родителей хромосомы 21p-.

© Л.В. ТАВОКИНА, С.Г. ВОРСАНОВА В.Д. ЗУКИН,
Н.И. СОПКО, В.М. ЗИНЧЕНКО, В.В. ВЕСЕЛОВСКИЙ,
А.М. БЫЧКОВА, Т.В. НИКИТЧИНА, Ю.Б. ЮРОВ, 2004

Введение. Принято считать, что изменение размеров гетерохроматиновых районов, как правило, не влечет за собой последствий для организма и лежит в основе нормального полиморфизма хромосом. Однако имеются наблюдения, что некоторые случаи аномалий у человека (врожденные пороки развития, нарушение репродуктивной функции и др.) могут сочетаться с экстремальными вариантами в размерах хромосом [1]. Вариабельность коротких плеч акроцентрических хромосом (увеличение размеров спутников, спутничных нитей, прицентромерного гетерохроматина либо их уменьшение вплоть до полного исчезновения) зависит от вариабельности последовательностей ДНК, формирующей эти регионы в геноме человека. По данным Nielsen et al. [2], частота встречаемости индивидуумов с делецией спутников (Dps- или Gps-) составляет 0,5–1,0 на 1000. Число публикаций, в которых дана молекулярная характеристика экстремальных хромосомных вариантов с потерей коротких плеч и центромерного гетерохроматина акроцентриков, крайне мало [3–6,], хотя очевидно, что накопление такого рода наблюдений позволит ответить на вопрос о пределах толерантности организма к колебаниям в количестве последовательностей ДНК, формирующей вариабельные регионы хромосом. Молекулярный состав коротких плеч акроцентрических хромосом описан в деталях. Эти регионы включают многократно повторяющиеся последовательности ДНК, такие как альфа-сателлиты, классические сателлиты 1 и 3, бета-сателлиты, теломерную ДНК и ДНК, кодирующую рибосомальную РНК [3].

Материалы и методы. Ультразвуковое исследование (УЗИ) плода проводили на сканере HDI 1500 ATL (США) с использованием конвексного широкополосного трансдюсера с частотой 5–2 МГц. Материал для цитогенетической диагностики плода получен в результате трансабдоминального амнио- и плацентоцентеза. Обработку биоптата плаценты и его кратковременное культивирование проводили по стандартным методам. Культуру амниоцитов получали согласно общепринятому протоколу. Хромосомные препараты отца, матери и здорового сибса были получены из лимфоцитов периферической крови. Для получения метафазных хромосом использовали стандартную технику с обработкой колхицином, гипотони-

ческой обработкой и метанол-уксусной фиксацией. Цитогенетическое исследование метафазных пластинок клеток ворсин плаценты, амниоцитов и лимфоцитов осуществляли с применением G- и C-методов дифференциального окрашивания хромосом по длине [7] и анализатора хромосом «Метаскан-2» производства фирмы «Оптрон» (Украина).

Для FISH-диагностики использовали клеточные суспензии лимфоцитов крови отца пробанда, фиксированные в метанол-уксусной кислоте (3:1). Гибридизация *in situ* проведена со специфическими к 21-й хромосоме альфоидными, бета-сателлитными, классическими сателлитными и теломерными ДНК-пробами из коллекции цитогенетической лаборатории Национального центра психического здоровья РАМН (г. Москва, Россия) [6]. Гибридизацию *in situ* осуществляли согласно протоколу, описанному подробно ранее [8, 9]. Для денатурации хромосомной ДНК препараты с фиксированными клетками дегидратировали в 70°, 80° и 100° этиловом спирте в течение 2 мин в каждом и высушивали на воздухе. ДНК пробы были нанесены на препараты в концентрации 20–50 нг в 10 мкл гибридизационного раствора. После нанесения ДНК проб на препараты хромосом проводилась их совместная денатурация при температуре 75 °С в течение 5 мин. Последующую гибридизацию с высокой и средней сте-

пенью жесткости осуществляли при 42 и 37 °С соответственно и отмывкой препаратов в 50%-ном формамиде, 2×SSC в течение 15 мин при 39 °С. Детекцию меченных биотином проб ДНК производили с использованием слоя флюоресцеин-авидина («Sigma»). Идентификацию хромосом осуществляли с помощью DAPI-окрашивания. Для флюоресцентной микроскопии были использованы следующие фильтры (Leica Mikroskopie und Systeme GmbH): А (№ 513596) для DAPI флюоресценции; I3 (№ 513719) или GR (№ 513821) для флюоресценции сигналов пропиридиумиодида или флюоресцеина.

Результаты исследований и их обсуждение. При УЗИ повторно беременной 26-летней женщины в сроке 21–22 нед у плода женского пола были обнаружены множественные врожденные пороки развития: ахондроплазия, диафрагмальная грыжа, двусторонняя пиелоктазия. Беременность была прервана по медицинско-генетическим показаниям в 24 нед, диагноз верифицирован патологоанатомом.

До прерывания беременности с помощью инвазивных методов диагностики был установлен кариотип плода — 46,XX,21p- (рис. 1). Анализ хромосом, окрашенных дифференциально С-методом, подтвердил полное отсутствие короткого плеча хромосомы 21 (гетерохроматина спутничных районов и части

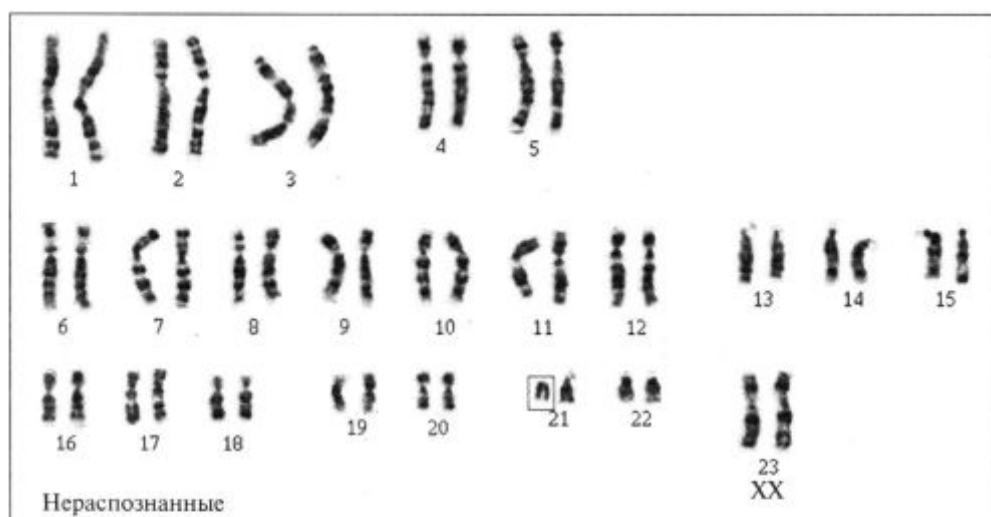


Рис. 1. Кариотип пробанда 46,XX, 21p-, 10-дневная культура амниоцитов получена из околоплодных вод, G-метод дифференциальной окраски хромосом. Хромосома 21p- обозначена □

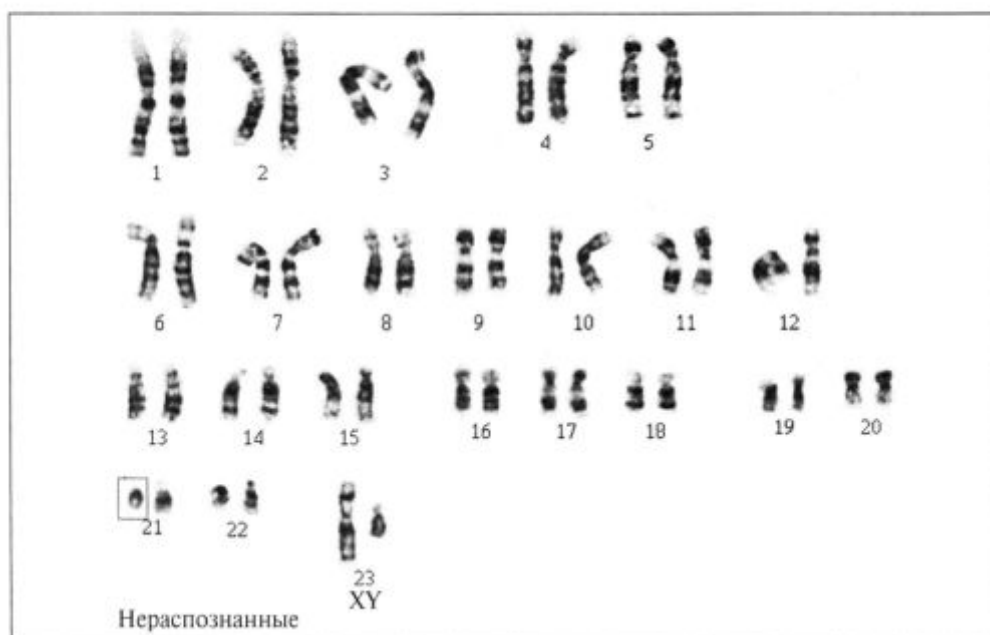


Рис. 2. Кариотип отца пробанда 46,XY,21p—, культура лимфоцитов крови, G-метод дифференциальной окраски хромосом. Хромосома 21p— обозначена □



Рис. 3. Кариотип отца пробанда с хромосомой 21p— после гибридизации с альфоидными ДНК-пробами (D13Z1/D21Z1). Можно видеть маленький гибридизационный сигнал в хромосоме 21p— (обозначен стрелкой), указывающий на делецию альфоидной ДНК центромеры, и три больших сигнала в нормальных хромосомах 21, 13, 13

центромерного гетерохроматина). Результаты анализа метафазных хромосом лимфоцитов периферической крови родителей и сибса оказались следующими: кариотип матери — 46,XX, кариотип отца — 46,XY,21p— (рис. 2), кариотип сибса — 46,XY. Следовательно, хромосома 21 с утеряннным коротким плечом была унаследована плодом от фенотипически здорового отца.

Молекулярная характеристика варианта 21p— была получена на лимфоцитах крови от-

ца пробанда в результате проведения флуоресцентной гибридизации *in situ* с ДНК-пробами, специфичными к короткому плечу и центромерному участку хромосомы 21 (теломерные, бета-сателлитные, рибосомальные, классические сателлитные и альфоидные ДНК-пробы). Положительная ДНК гибридизация наблюдалась в центромерном участке при использовании альфоидной ДНК-пробы (D13Z1/D21Z1), специфичной для гетерохроматинового участка хромосомы 21. Также наблюдались отчетливые FISH-сигналы в теломерных участках хромосомы 21 при использовании теломерной ДНК-пробы. Никаких микротранслокаций или инсерций, несущих последовательности ДНК короткого плеча хромосомы 21, в составе других хромосом не обнаружено. Исследование FISH-методом показало, что разрывы произошли в пределах альфоидной ДНК, затронув, с одной стороны, район центромерного гетерохроматина, а с другой стороны — в прителомерном районе, не затронув активную центромеру. Это привело к делеции короткого плеча хромосомы 21 (рис. 3).

Акроцентрические хромосомы человека, входящие в группу G, с утерянной большей частью материала их коротких плеч принято

называть Christchurch (Ch1) хромосомами и рассматривать как потенциально aberrантные [10, 11]. В то же время в литературе описаны семейные случаи с сегрегацией хромосомы 21p- от здоровых родителей к нормальному потомству [5, 6]. Один случай делеции de novo 21p при Ch 1 был ассоциирован с умственной отсталостью и ВПР, включающими пренатальную гипоплазию, микроцефалию, низко расположенные диспластичные ушные раковины, короткий нос, микрогнатию и короткую шею [6].

Напротив, семейный случай, описанный в настоящей работе, указывает на то, что хромосома 21p-, обнаруженная в кариотипе здорового отца, была передана плоду с множественными врожденными пороками развития, а не возникла de novo. Несмотря на то, что описываемые гетерохроматиновые участки хромосомы 21 либо не содержат транскрибируемых генов, либо представлены большим числом одинаково транскрибируемых копий (рибосомальная РНК), их потеря может привести к дисбалансу в организации и функционировании генома в целом. Известно, что соотношение эухроматина и гетерохроматина в хромосомах — стабильный и эволюционно закрепленный в геноме показатель [12]. Вполне вероятно, что изменение этого соотношения может нарушать устойчивость генома, а это является тем неблагоприятным генетическим фоном, который способствует реализации патологических мутаций, всегда имеющих в любом организме.

Следовательно, рассматривать делецию короткого плеча хромосомы 21 всего лишь как экстремальный вариант нормы не совсем корректно. На наш взгляд, фенотипически здоровых носителей такого варианта необходимо относить к группе риска и особенно быть внимательными к супружеским парам, имеющим в кариотипе подобные хромосомные варианты и планирующим рождение ребенка.

Несмотря на то, что полная делеция коротких плеч акроцентрических хромосом у человека — явление довольно редкое, описание подобных случаев позволит в дальнейшем ответить на вопрос о роли вариабельных последовательностей сателлитной ДНК в возникновении МВВР.

SUMMARY. Results of cytogenetic research of placental villi and amniotic fluid cells culture of the 22-weeks-old fetus with multiple congenital malformations (MCM) are presented. The absence of the short arm in one of the homologues of the chromosome 21 was revealed. Cytogenetic analysis of the fetus father's blood lymphocytes determined the similar chromosome. Further research of the father's karyotype made by FISH-method using specific DNA samples had discovered the absence of subtelomeric parts in the short arm of the chromosome 21 that might be considered as a deletion. It was suggested that the effect of position and interaction of genes could play a key role in appearing of MCM in the fetus in the case when the 21p-chromosome was transferred to it from the healthy parents.

РЕЗЮМЕ. Наведено результати цитогенетичного дослідження ворсин плаценти та культури амніоцитів плоду 22 тиж з множинними вродженими вадами розвитку (МВВР). В кариотипі плоду у одного із гомологів хромосоми 21 знайдена відсутність короткого плеча. Аналогічна хромосома виявлена також при цитогенетичному дослідженні лімфоцитів крові фенотипово здорового батька пробанда. Подальше дослідження кариотипу батька FISH-методом з використанням специфічних ДНК проб показало відсутність субтеломерних районів короткого плеча хромосоми 21, що можна розцінювати як делецію. Висловлено припущення, що ефект положення генів та їх взаємодія можуть відігравати вирішальну роль для плоду у виникненні МВВР в разі наслідування від здорових батьків хромосоми 21p- при наявності делеції короткого плеча хромосоми 21.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Прокофьева-Бельговская А.А. Гетерохроматические районы хромосом. — М.: Наука, 1986. — 465 с.
2. Nielsen J., Friedrich U., Hreidarsson A.B. Frequency of deletion of short arm satellites in acrocentric chromosomes // J. Med. Genet. — 1974. — 11. — P. 177–180.
3. Verma R.S., Batish S.D., Gogineni S.K., Kleyman S.M., Stetka D.S. Centromeric aphoid DNA heteromorphism of chromosome 21 revealed by FISH-technique // Clin. Genet. — 1997. — 51. — P. 91–93.
4. Liehr T., Pfeiffer R.A., Trautmann U., Gebhart E. Centromeric aphoid DNA heteromorphisms of chromosome 22 revealed by FISH-technique // Clin. Genet. — 1998. — 53. — P. 231–232.
5. Conte R.A., Mathews T., Kleyman S.M., Verma R.S. Molecular characterization of 21p- variant chromosome // Clin. Genet. — 1996. — 50. — P. 103–105.
6. Vorsanova S.G., Yurov Y.B., Brusquant D., Carles E., Roizes G. Two new cases of the christchurch (Ch 1) chromosome 21: evidence for clinical consequences of de novo deletion 21p- // Cytol. and Genet. — 2002. — 36, № 1. — P. 46–49.
7. Sumner A.T. New technique for distinguishing between human chromosomes // Nature. — 1971. — 233. — P. 31–32.

8. Soloviev I.V., Yurov Yu.B., Vorsanova S.G., Malet P. Microwave activation of fluorescence in situ hybridization; novel method for rapid chromosome detection and analysis // Focus. — 1994. — **16**, № 4. — P. 115–116.
9. Soloviev I.V., Yurov Yu.B., Ioannou P., Georgiou A., Hadjimarcou M., Patsalis P., Roizes G., Sharonin V.O., Kravets V.S., Vorsanova S.G. Identification and molecular-cytogenetic characterization of large subset of human plasmids, cosmids, PAC and YAC clones: the search of DNA probes for pre- and postnatal diagnosis // Cs. Pediat. — 1997. — **52**, № 7. — P. 529–538.
10. Soloviev I.V., Yurov Yu.B., Vorsanova S.G., Fayet F., Roizes G., Malet P. Prenatal diagnosis of trisomy 21 using interphase fluorescence in situ hybridization of post-replicated cells with site-specific cosmid and cosmid contig probes // Prenatal diagnosis. — 1995. — **15**. — P. 237–248.
11. Guntz F.W., Fitzgerald P.H., Adams A. An abnormal chromosome // Brit. Med. J. — 1962. — **2**. — P. 1097.
12. John B., Milkos G. Functional aspects of satellite DNA and heterochromatin // Intern. Rev. Cytol. — 1979. — **58**. — P. 1–114.

Поступила 19.05.03