



Головатая Е.И.^{1,2} ✉, Голубева С.В.¹, Мотюк И.Н.³

¹ Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя», Минск, Беларусь

² Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь

³ Гродненский областной клинический перинатальный центр, Гродно, Беларусь

Легко ли поставить цитогенетический диагноз? Примеры двух клинических случаев с мозаицизмом по 18-й хромосоме

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования, лабораторные данные, редактирование – Головатая Е.И.; клинические данные, написание текста – Голубева С.В.; клинические данные, написание текста – Мотюк И.Н.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Подана: 22.10.2021

Принята: 31.01.2022

Контакты: gvhelena@yandex.ru

Резюме

В статье представлены два наблюдения с хромосомными аномалиями: 1) частичная моносомия длинного плеча 18-й хромосомы размером 29 Mb в мозаичной форме; 2) частичная моносомия длинного плеча 18-й хромосомы размером 14 Mb, представленная в двух клонах клеток (с делетированной и кольцевой хромосомами). Материалом для исследования были клетки периферической крови. Рассмотрены клинические данные, этапы постановки генетического диагноза, роль генетического консультанта в установлении генетической патологии, результаты исследований методами стандартного кариотипирования (GTG-banding) и хромосомного микроматричного анализа (SNP array). Делеция генетического материала выявлена с помощью хромосомного микроматричного анализа, окончательный кариотип установлен по совокупности результатов двух методов. Проанализирована возможность выявления структурной перестройки и мозаицизма разными методами исследования.

Ключевые слова: делеция 18q, мозаицизм, стандартное кариотипирование, хромосомный микроматричный анализ

Golovataya E.^{1,2} , Holubeva S.¹, Matsiuk I.³

¹ Republican Scientific and Practical Center "Mother and Child", Minsk, Belarus

² Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus

³ Grodno Regional Clinical Perinatal Center, Grodno, Belarus

Is It Easy to Supply a Cytogenetic Diagnosis? Examples of Two Clinical Cases with Mosaicism on the 18th Chromosome

Authors' contribution: research concept and design, conducting of laboratory research, editing – Golovataya E., writing text, material collection – Holubeva S., description and observation of patients, writing text – Matsiuk I.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Submitted: 22.10.2021

Accepted: 31.01.2022

Contacts: gvhelena@yandex.ru

Abstract

The article presents two observations with chromosomal aberrations: 1) mosaic partial monosomy of the long arm of the 18th chromosome, 29Mb in size; 2) partial monosomy of the long arm of chromosome 18, 14Mb in size, presented in two clones of cells (with deleted and ring chromosomes). The material for the study were peripheral blood cells. Clinical data, stages of a genetic diagnosis, the role of the genetic consultant in the identification of genetic pathology, research results by standard karyotyping (GTG-banding) and chromosomal microarray analysis (SNP array) are considered. Deletion of the genetic material was detected using chromosomal microarray analysis, the final karyotype was established by the combination of the results of the two methods. The possibility of revealing structural rearrangement and mosaicism by different research methods is analyzed.

Keywords: deletion 18q, mosaicism, standard karyotyping, chromosomal microarray analysis

■ ВВЕДЕНИЕ

В клинической практике врач-генетик часто сталкивается с ситуацией, когда затребованные лабораторные исследования не дают основания для постановки генетического диагноза. Пациент может на многие годы или навсегда оставаться с невыясненным диагнозом. Это является довольно критической ситуацией для определения риска появления подобных нарушений при следующих планируемых беременностях.

Появление новых лабораторных технологий генетического анализа (хромосомный микроматричный анализ, секвенирование нового поколения) с их революционно высоким разрешением позволило значительно чаще выявлять патогномичные генетические нарушения. Знания о возможностях новых диагностических методов являются решающими в работе врача-генетика. Не менее важным аспектом являются

и знания о природе генетических нарушений, когда и какие анализы наиболее рационально заказывать при конкретной клинической ситуации.

До настоящего времени основным методом диагностики хромосомных нарушений является метод стандартного кариотипирования. В силу менее субъективного характера исследований (но не интерпретации), по сравнению с классическим цитогенетическим анализом (стандартное кариотипирование), хромосомный микроматричный анализ может нивелировать влияние человеческого фактора или неоднозначность существующего протокола при проведении рутинных исследований.

В этой статье мы приводим анализ двух случаев, когда введение в диагностический процесс хромосомного микроматричного анализа позволило разобраться в природе генетических нарушений и причинах неудач классического цитогенетического исследования.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования была периферическая кровь. С целью выявления хромосомных перестроек использовались два метода:

- 1) стандартное кариотипирование;
- 2) хромосомный микроматричный анализ.

Стандартное кариотипирование проводилось с помощью стандартной методики GTG-banding. Хромосомный микроматричный анализ выполнялся с использованием микрочипов Illumina CytoSNP-12 v2.1, Illumina CytoSNP-850K v1.1, системы NextSeq550 (Illumina, США) согласно рекомендациям производителя. Использовался SNP array (Illumina). Данный тип анализа кроме количества геномных копий (Log R Ratio) показывает количество аллелей (B-Allele Frequency). Результаты были визуализированы в программе BlueFuse Multi (Illumina, США). Интерпретация микроаббераций проведена с использованием онлайн-версий Базы данных геномных вариантов DGV (Database of Genomic Variants), DECIPHER (Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources), каталога наследственных болезней «Менделевское наследование у человека» (OMIM).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

Наблюдение 1. Доношенный ребенок, девочка с пренатальной гипотрофией. В неонатальном периоде наблюдались синдром срыгивания и рвоты, проблемы вскармливания, гастроэзофагеальный рефлюкс. Ребенок развивался с физической, психомоторной задержкой. Неврологический статус: мышечная гипотония, горизонтальный нистагм, шумное дыхание. Лицевые особенности: брахицефалия, плоский затылок, выступающий лоб, микроцефалия, сглаженные надбровные дуги, прямые брови, глубоко посаженные глаза, узкие глазные щели, широкая спинка носа, клювовидный нос, гипоплазия крыльев носа, короткий фильтр, высокое нёбо, «карпообразный» рот, гипоплазия средней трети лица. Костная система: левосторонняя косолапость, аномальная установка первых пальцев стоп. Особенности дерматоглифики ладоней. Кожные изменения: атопический дерматит. Атрофия зрительных нервов. Нейросонография, МРТ головного мозга: субэпендимальные многокамерные кисты с обеих сторон; атрофический процесс в веществе головного мозга. Первая версия диагноза: «хромосомная болезнь». Однако хромосомной патологии с использованием стандартного кариотипирования не выявлено (кариотип 46,XX).

В связи с подозрением на наследственную этиологию заболевания диагностический поиск продолжился: диагностика микроделеционных синдромов методом MLPA; анализ активности лизосомных ферментов; диагностика митохондриальных заболеваний; селективный скрининг наследственных болезней обмена (пробы крови и мочи); тандемная масс-спектрометрия сухих пятен крови (профиль аминокислот и ацилкарнитинов в норме); диагностика синдрома Ретта методом ПЦР. Изменений не выявлено, комплекс клинических проявлений оставался неклассифицированным. Таким образом, к 5 годам генетический диагноз ребенку не был установлен. В нашем центре в это время был внедрен хромосомный микроматричный анализ. Врач-генетик по-прежнему предполагал хромосомную патологию и поэтому настоял на проведении анализа хромосомного статуса новым внедренным в практику методом. Была установлена делеция участка 18-й хромосомы 18q21.2→18qter в мозаичной форме (arr[GRCh37] 18q21.2q23(48402338-77833127)x1) (рис. 1). Сопоставление фенотипов нашего пациента и описанных ранее пациентов с делецией 18q обнаружило совпадение по основным признакам: задержка развития, лицевые дисморфии, аномалии конечностей, атрофический процесс в мозге, кожные проявления.

Размер делеции составил 29 Mb и должен был быть виден при стандартном кариотипировании. Проведение реанализа выявило 15% мозаицизм: 46,XX,del(18)(q21.2)[15]/46,XX[85] (рис. 2).

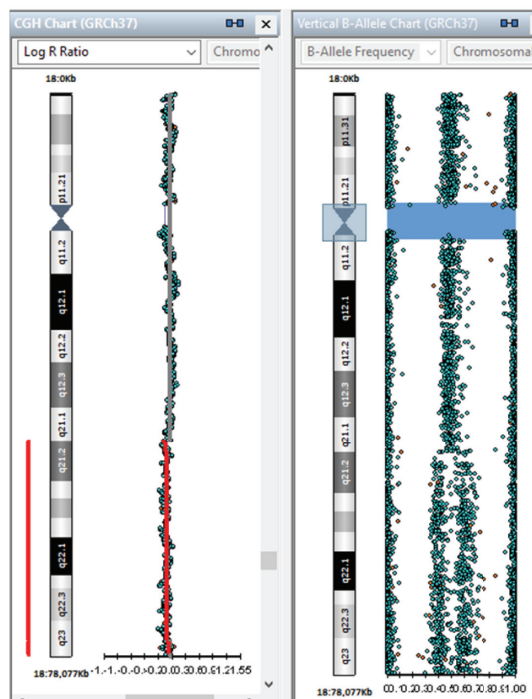


Рис. 1. Результаты хромосомного микроматричного анализа: 18-я хромосома
Fig. 1. Chromosome microarray analysis results: chromosome 18

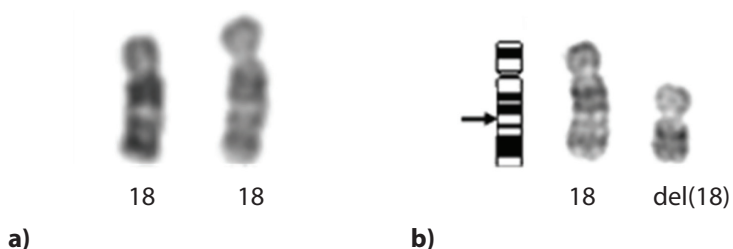


Рис. 2. Результаты стандартного кариотипирования: а) нормальные 18-е хромосомы, б) делеция 18-й хромосомы

Fig. 2. Results of standard karyotyping: a) normal 18th chromosomes, b) deletion of 18th chromosome

Наблюдение 2. Доношенный ребенок, девочка. Ребенок развивался с физической, психомоторной, задержкой. При осмотре в 9 месяцев выявлены множественные врожденные особенности развития: плоское переносье, гипертелоризм, монголоидный разрез глаз, узкая кайма губ, углы рта опущены, мышечный тонус снижен, брахидактилия кистей, клинодактилия V пальца. Голову ребенок держал с 3,5 месяца, первые зубы появились в 7 месяцев, в 9 месяцев переворачивался вяло, не сидел. Клинический диагноз в 9 месяцев: раннее органическое поражение головного мозга с выраженной задержкой психомоторного развития, атонически-астатическим синдромом, врожденное отсутствие, атрезия и стриктура левого слухового прохода, сужение правого слухового прохода. При исследовании клеток

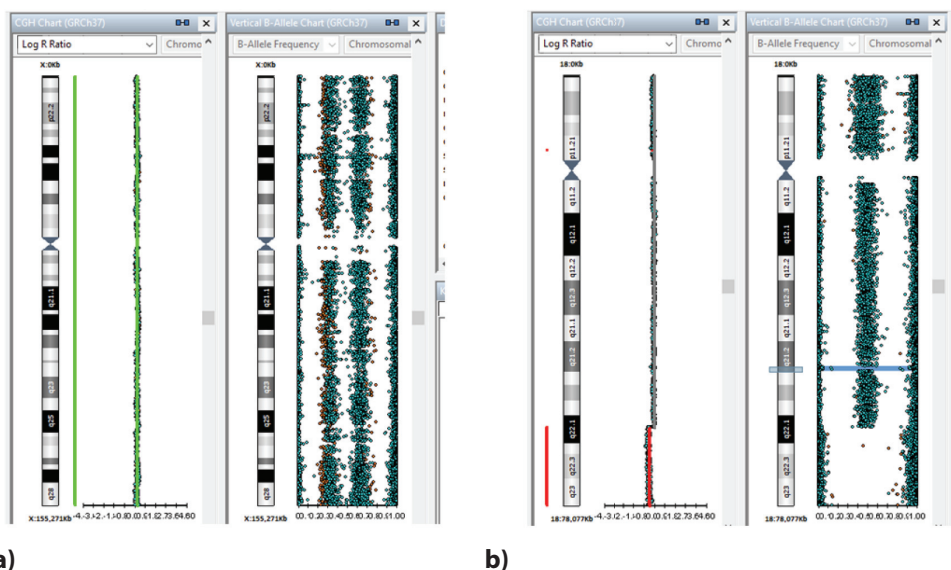


Рис. 3. Результаты хромосомного микроматричного анализа: а) трисомия X-хромосомы, б) частичная моносомия 18-й хромосомы

Fig. 3. Results of chromosomal microarray analysis: a) trisomy of the X chromosome, b) partial monosomy of the 18th chromosome

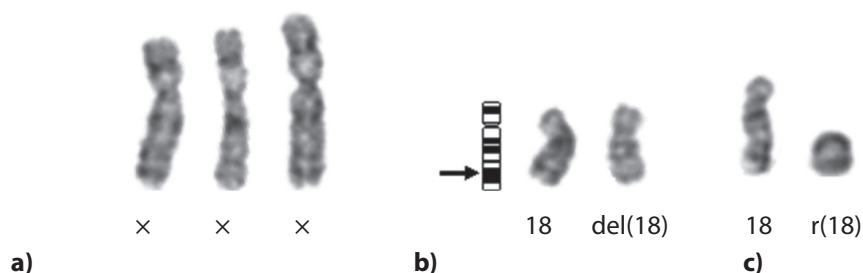


Рис. 4. Результаты стандартного кариотипирования: а) трисомия X-хромосомы, б) делеция 18-й хромосомы; с) кольцевая 18-я хромосома
Fig. 4. The results of standard karyotyping: a) trisomy of the X chromosome, b) deletion of the 18th chromosome; c) ring 18th chromosome

периферической крови методом стандартного кариотипирования в возрасте одного года установлен кариотип 47,XXX. Однако данный кариотип не объяснял симптомокомплекс, наблюдаемый у ребенка. Генетический диагноз к 7 годам у ребенка так и не был установлен. В связи с наступлением новой беременности у матери остро встал вопрос прогноза беременности, особенно с учетом того, что врач-генетик подозревал хромосомную природу заболевания у ребенка. Был выполнен хромосомный микроматричный анализ. По результатам анализа установлена трисомия X-хромосомы: Xp22.33q28(60814-155236712)x3; а также моносомия участка длинного плеча 18-й хромосомы: 18q22.1q23(63849680-78015180)x1 (рис. 3).

Выявленная перестройка сочетается с симптомокомплексом нашего пациента. Размер делеции составил 14 Mb и должен был быть виден при стандартном кариотипировании. Проведение повторного анализа методом стандартного кариотипирования выявило мозаицизм по структурной перестройке 18-й хромосомы: 47,XXX,del(18)(q22)[88]/47,XXX,r(18)(p11.3?q22)[12] (рис. 4).

■ ОБСУЖДЕНИЕ

Хромосома 18 составляет около 2,5% всей ДНК в клетках и содержит около 270 кодирующих генов. Делеции 18-й хромосомы встречаются с частотой 1 : 40 000, но точки разрывов крайне разнообразны, что объясняет вариабельность клинических проявлений [1, 2]. В большинстве случаев патология de novo. Более общие признаки 18q-делеций (например, деформации стопы, атрезия слуха, дисмиелинизация, нистагм, низкий рост) наблюдаются у лиц, у которых отсутствует только дистальная часть 18q22.3-qtel (рис. 5) [3].

В обоих наших наблюдениях выявлена одна и та же перестройка – частичная делеция длинного плеча 18-й хромосомы, но в первом наблюдении размер составил 29 Mb, во втором наблюдении – 14 Mb. Есть и еще одно различие: в первом наблюдении делеция присутствует в мозаичной форме, во втором – в полной. Критический участок синдрома 18q- отсутствует в обоих случаях. У обоих детей наблюдается ряд общих черт: задержка физического и психомоторного развития, лицевые дисморфии, гипотония, атрофические процессы в мозге. Есть и различия: у первого ребенка – атрофия зрительных нервов, деформации нижних конечностей, атопический дерматит, у второго – аномалии слуха. Эта вариабельность может объясняться как размером делеции, так и другими факторами. По данным литературы, многие

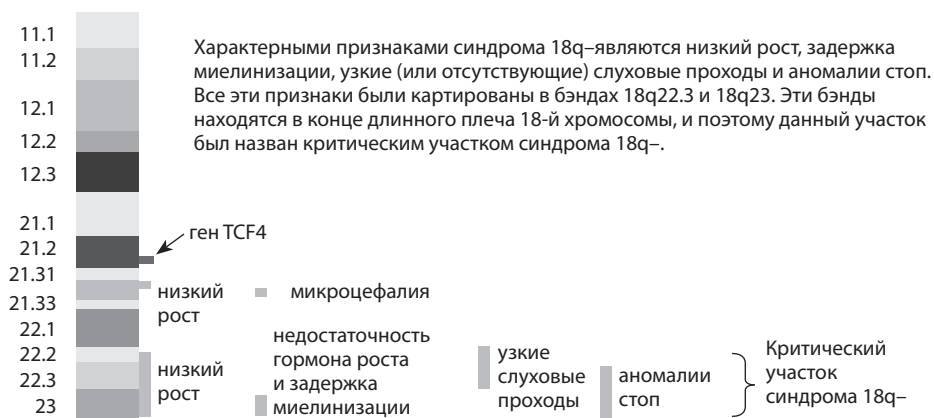


Рис. 5. Структура длинного плеча 18-й хромосомы [4]
Fig. 5. The structure of the long arm of the 18th chromosome [4]

клинические проявления могут широко варьировать у разных пациентов даже при одинаковых делециях. На фенотип могут оказывать влияние состав аллелей в гаплоидном участке, гены в других районах хромосом, мозаицизм и другие факторы [3]. Все вышеизложенное должен учитывать врач-генетик в поисках причины генетической патологии.

Мозаицизм представляет собой наличие в организме, развившемся из одной зиготы, двух или более популяций клеток с разными генотипами. Мозаицизм описан для многих типов хромосомных аномалий, включая трисомии, моносомии, делеции, дупликации и т. д. Возможность выявления мозаицизма по хромосомным перестройкам зависит от используемых методов и от типа мозаицизма. При использовании стандартного кариотипирования проводится морфологический анализ митотических хромосом, т. е. исследуются хромосомы как по форме, так и по размеру. Мозаицизм при этом методе может быть не выявлен по следующим причинам: недостаточный уровень разрешения, анализ ограниченного числа делящихся клеток, субъективный выбор клеток для исследования, профессиональный уровень цитогенетика. При использовании хромосомного микроматричного анализа исследуют ДНК всех клеток во взятом образце на разных стадиях клеточного цикла. Поскольку исследуется ДНК, то морфологический анализ хромосом провести невозможно, в отличие от метода стандартного кариотипирования, и можно выявить мозаицизм только по размеру несбалансированного участка. Возможность выявления мозаицизма зависит от его уровня, используемой платформы, разрешающей способности метода. Платформа SNP использует комбинацию данных интенсивности и генотипирования, что позволяет выявлять даже 5–10% мозаицизм по несбалансированным перестройкам [5].

Мозаичный кариотип в обоих наших наблюдениях первично не был установлен методом стандартного кариотипирования. В первом наблюдении после получения результатов с помощью хромосомного микроматричного анализа (частичная моносомия участка длинного плеча 18-й хромосомы в мозаичной форме) при проведении

реанализа препаратов, полученных методом стандартного кариотипирования, был установлен 15% мозаицизм. Данная перестройка в полной форме не представляет проблем для выявления (размер делеции 29 Mb). Причиной получения нормального кариотипа при первом анализе, вероятно, явилось стандартное, в данном случае недостаточное, количество проанализированных клеток. Всего было исследовано 25 метафазных пластинок, что теоретически достаточно для выявления 12% мозаицизма с вероятностью 95%, однако на практике это не всегда достижимо в связи с субъективным отбором клеток для анализа [6]. При реанализе исследовали большое число клеток, проводился прицельный поиск предполагаемой патологии.

Во втором наблюдении при проведении хромосомного микроматричного анализа выявлена делеция длинного плеча 18-й хромосомы в полной форме. Повторный анализ был направлен на поиск именно этой патологии, но при исследовании стандартного количества клеток ($n=25$) были выявлены морфологически разные структурные перестройки 18-й хромосомы (делеция и кольцевая хромосома), при исследовании 100 клеток мозаицизм был подтвержден. В этом случае причинами пропуска мозаицизма при первичном анализе были следующие: ограниченное количество проанализированных клеток, а также, вероятно, неудовлетворительное качество препаратов / недостаточный уровень подготовки цитогенетика. Обе перестройки характеризовались одинаковой делецией генетического материала, что и явилось основанием выявления полной делеции методом хромосомного микроматричного анализа. В данном случае мозаицизм не связан с изменением генетического материала, а выражается в различном морфологическом представлении 18-й хромосомы. Именно поэтому мозаицизм в данном образце может быть выявлен только методом стандартного кариотипирования. Структурный мозаицизм, представленный двумя клонами клеток, один из которых с кольцевой 18-й хромосомой, может быть дополнительным модифицирующим фактором проявлений уже существующей патологии в виде частичной моносомии 18q-.

Несмотря на первичное получение нормального кариотипа в наших двух случаях, исключительно благодаря позиции врача-генетика был продолжен поиск хромосомной причины наблюдаемых клинических проявлений с помощью высокоразрешающего метода исследования (хромосомный микроматричный анализ), что привело к установлению генетического диагноза. У метода стандартного кариотипирования есть свои ограничения, в частности в возможности выявления мозаицизма. Чем меньше процент мозаицизма, чем меньше размер несбалансированного фрагмента, тем менее вероятно установление мозаичного кариотипа с помощью классического метода стандартного кариотипирования. Кроме того, принципиальное значение при работе этим методом имеет качество приготовленных препаратов (разрешение) и уровень подготовки цитогенетика. Постановка генетического диагноза требует тесного взаимодействия врача-генетика со специалистами лабораторной службы.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Постановка генетического диагноза – это сложный многоэтапный процесс, который начинается врачом-генетиком и заканчивается им. Плодотворное и тесное взаимодействие клинических генетиков и врачей лабораторной диагностики имеет место только в том случае, если врач-генетик хорошо понимает возможности и ограничения заказываемых исследований, а специалисты лабораторной службы,

со своей стороны, должны представлять клиническую составляющую предполагаемых диагнозов. Такое сотрудничество могло бы сократить время установления генетического диагноза, а также исключить проведение необоснованных исследований.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Heard P.L., Carter E.M., Crandall A.C. (2009) High Resolution Genomic Analysis of 18q— using oligomicroarray Comparative Genomic Hybridization (aCGH). *Am J Med Genet A*, vol. 149A, no 7, pp. 1431–7. doi: 10.1002/ajmg.a.32900.
2. Sheth H., Trivedi S., Liehr T. (2020) Mosaic chromosome 18 anomaly delineated in a child with dysmorphism using a three-pronged cytogenetic techniques approach: a case report. *BMC Medical Genomics*, vol. 13: 141. doi: 10.1186/s12920-020-00796-9.
3. Linnankivi T., Tienari P., Somer M. (2006) 18q deletions: clinical, molecular, and brain MRI findings of 14 individuals. *Am J Med Genet A*, vol. 140, no 4, pp. 331–9. doi: 10.1002/ajmg.a.31072.
4. Rare Chromosome Disorder Support Group (Unique) (2018) *Rare Chromosome & Gene Disorder Guides*. Available at: <http://www.rarechromo.org>.
5. Conlin L.K., Thiel B.D., Bonnemann C.G. (2010) Mechanisms of mosaicism, chimerism and uniparental disomy identified by single nucleotide polymorphism array analysis. *Human Molecular Genetics*, vol. 19, no 7, pp. 1263–75. doi:10.1093/hmg/ddq003.
6. Hook E.B. (1977) Exclusion of chromosomal mosaicism: tables of 90, 95 and 99% confidence limits and comments on use. *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 29, pp. 94–7.