

ХАРАКТЕРИСТИКА ВИПАДКІВ КІЛЬЦЕВОЇ ХРОМОСОМИ 22 У ДІТЕЙ ІЗ ЗАТРИМКОЮ СТАТО-КІНЕТИЧНОГО ТА ПСИХО-МОВНОГО РОЗВИТКУ

В.В. Куракова, Ш.А. Кульбалаєва, В.О. Галаган, М.А. Циганкова

Національна дитяча спеціалізована лікарня (НДСЛ) "ОХМАТДИТ"

Спеціалізований медично-генетичний центр, м. Київ

Реферат

У статті подано опис клінічної характеристики і лабораторної діагностики двох випадків кільцевої хромосоми 22, які виявлено у дітей із грубою затримкою стато-кінетичного і психо-мовного розвитку при рутинному хромосомному аналізі з подальшим використанням підтверджуючої діагностики за допомогою флуоресцентної *in situ* гібридизації.

Мета. Проведення кореляційного аналізу між клінічними та лабораторними даними у пробандів із виявленою патологією у вигляді кільцевої хромосоми 22.

Матеріал і методи. Дітей скеровували із різних регіональних медичних установ й обстежували на базі Київського медично-генетичного центру дитячої лікарні "ОХМАТДИТ". Для встановлення типу хромосомної перестройки використовували метод стандартного каріотипування, При флуоресцентній *in situ* гібридизації використовували двокольоровий ДНК-зонд DiGeorge Region Probe - LSI TUPLE1 SpectrumOrange/LSI ARSA SpectrumGreen (Vysis).

Результати й обговорення. Під час рутинного аналізу хромосом у дітей із підозрою на хромосомну патологію ми виявили два випадки кільцевої хромосоми 22. З'ясовано, що клінічні особливості двох обстежених пацієнтів неспецифічні, тобто без цитогенетичного обстеження діагноз хромосомної патології поставити важко. В обох випадках проводили стандартне каріотипування і виявили аномальну хромосому 22. При дослідженні за допомогою флуоресцентної *in situ* гібридизації червоні сигнали локусу HIRA (22q11.2) представлено на обох хромосомах 22, але зелений сигнал, тобто локус 22q13.3, є лише на одній структурно нормальній хромосомі 22, на іншій (кільцевій) він відсутній. Моносомія довгого плеча хромосоми 22, а саме локусу 22q13.3, є характерною для синдрому Фелан-МакДеміда, наявність якого встановлюється на основі діагностики за допомогою флуоресцентної *in situ* гібридизації на вже вказаний локус.

Висновок. Діти із затримкою фізичного, стато-кінетичного та психо-мовного розвитку підлягають обов'язковому стандартному каріотипуванню та, при необхідності, молекулярно-цитогенетичному дослідженню у вигляді FISH-діагностики та інших специфічних молекулярно-генетичних методів. Порівнюючи дані наведеного дослідження, пробанди, в каріотипі яких виявлена кільцева хромосома 22, не мали специфічних клінічних ознак. Клінічні ознаки нагадують прояви, характерні при моносомії локусу 22q13.3, що у джерелах літератури описане як синдром Фелан-МакДеміда.

Ключові слова: хромосомна патологія, кільцева хромосома 22, синдром Фелан-МакДеміда

Abstract

DESCRIPTION OF CASES OF RING CHROMOSOME 22 IN CHILDREN WITH STATIC-KINETIC AND MENTAL-SPEECH DELAY

V.V. KURAKOVA, Sh.A. KULBALAEVA, V.O. GALAGAN, M.A. TSYGANKOVA

National children special hospital "OKHMATDYT"

The Center of Medical Genetics, Kyiv, Ukraine

This article describes the clinical features and laboratory diagnostics in two cases of ring chromosome 22, which was found in children with severe static-kinetic and mental-speech delay during routine chromosome analysis and subsequent fluorescent *in situ* hybridization diagnostics.

Aim. To carry out a correlation analysis between clinical and laboratory data of probands with a ring chromosome 22.

Materials and Methods. Children were referred from various regional medical facilities and examined in Kiev Medical Genetic Center at the "OKHMATDYT" Hospital. The method of standard karyotyping was used for determination of the type of chromosomal rearrangements. For fluorescent *in situ* hybridization was used a two-color DNA probe DiGeorge Region Probe - LSI TUPLE1 SpectrumOrange / LSI ARSA SpectrumGreen (Vysis).

Results and Discussion. During the routine chromosome analysis in children with suspected chromosomal pathology we found two cases of ring chromosome 22. The results showed that the clinical features of the two patients were nonspecific, i.e., cytogenetic diagnostics is necessary for chromosomal aberrations determination. In both cases the abnormal chromosome 22 was detected during the method of standard karyotyping. After fluorescent *in situ* hybridization red signals of the HIRA locus (22q11.2) were on both chromosomes 22, but the green signal, locus ARSA 22q13.3, on only one normal chromosome 22; in another chromosome 22 (ring) it is absent. The monosomy of the long arm of chromosome 22, locus 22q13.3, is distinctive of a well-described Phelan-McDermid syndrome, which is determined by FISH-diagnosis of the above locus.

Conclusion. Children with delayed physical, static-kinetic and mental-speech development delay are subject to mandatory standard karyotyping and, if necessary, molecular cytogenetic analysis in FISH-specific diagnostics and other molecular genetic techniques. On comparison of the results of the study, proband karyotypes in which a ring chromosome 22 was revealed had no specific clinical signs. Clinical signs are similar to manifestations characteristic of 22q13.3 locus monosomy, which is described in literature

as the Phelan-McDermid syndrome.

Keywords: chromosomal aberrations, ring chromosome 22, Phelan-McDermid Syndrome

Вступ

Хромосомна патологія на сьогодні відноситься до тяжких форм вродженої патології і є складною як у клінічній, так й у лабораторній діагностиці. Серед усіх пацієнтів, які вперше проходять медично-генетичне консультування у спеціалізованому медично-генетичному центрі (СМГЦ) НДСЛ "ОХМАТДИТ", виділяється значна група (біля 40%) із затримкою фізичного, стато-кінетичного, психо-мовного та розумового розвитку.

При цитогенетичному обстеженні цієї групи дітей поява кільцевих хромосом, серед інших незбалансованих хромосомних перебудов в каріотипі пацієнтів, відноситься до рідкісних форм спорадичних випадків [1]. Серед усіх кільцевих хромосом найчастіше трапляється кільцева хромосома 22. Вперше така перебудова була описана Weleber та групою авторів у 1968 р. [2]. Загалом приведено біля 60 випадків кільцевих хромосом 22, про що вказано у різних джерелах медичної літератури [2, 3, 4].

Метою дослідження було проведення кореляційного аналізу між клінічними та лабораторними даними у пробандів із виявленою патологією у вигляді кільцевої хромосоми 22.

Матеріал і методи

Працю виконано у СМГЦ НДСЛ "ОХМАТДИТ" на основі проспективного медично-генетичного консультування (МГК) дітей. При проведенні МГК використано результати як загально-клінічних, так й генетичних методів, а саме: клінічно-генеологічного, цитогенетичного та молекулярно-цитогенетичного. Обстежено дві сім'ї пробандів, яких скеровано на МГК із різних регіонів України з діагнозом затримки фізичного та психо-мовного розвитку.

Для встановлення типу хромосомної перебудови використовували метод стандартного каріотипування: стимульовані ФГА і культивовані 72 години лімфоцити венозної крові, оброблені гіпотонічним розчином і фіксовані у 3:1 етанолоцтовій кислоті; пофарбовані фарбником Гімза із попередньою обробкою предметних скелець трипсином. [5]. Аналіз хромосом проводили з

допомогою системи автоматичного розбору хромосом Applied Spectral Imaging (Ізраїль), якість хромосом - не менше, ніж 400-500 сегментів на гаплоїдний набір, аналізували не менше 20 метафазних пластинок.

Флуоресцентну *in situ* гібридизацію (FISH) застосовано в обох випадках. Для аналізу використано двокольоровий ДНК-зонд DiGeorge Region Probe - LSI TUPLE1 SpectrumOrange/LSI ARSA SpectrumGreen (Vysis). Розмір досліджуваного локусу ARSA становив 334 kb: починався від центромери з гену SBF1 і закінчувався в інтервалі між генами SHANK3 і ACR. Метод приготування FISH-препаратів проводили згідно з інструкцією виробника [6]. Предметні скельця після гібридизації і відмивки обробляли флуоресцентним барвником DAPI, аналіз хромосом проводили на флуоресцентному мікроскопі Olympus. Характеристику розташування досліджуваних регіонів хромосоми 22 подано на рис 1.

Будь-яка кільцева хромосома утворюється шляхом розриву термінальних субтеломерних послідовностей короткого і довгого плеча і утворенням так званих "липких" кінців, що змикаються у кільце [7]. Втрата генетичного матеріалу на короткому плечі хромосоми 22, загалом, не супроводжується патологічними клінічними виявами. При втраті субтеломерних послідовностей довгого плеча (зокрема, у локусі 22q13.3), є чітко виражені клінічні симптоми [8]. Відомо близько 250 генів, які містяться у локусі 22q13.3 і втрата яких призводить до розвитку патології. Зокрема,

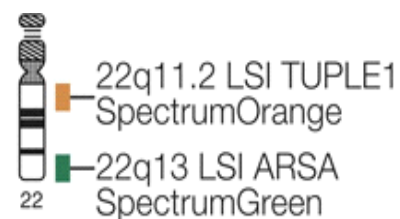


Рис. 1

Схематичне розташування сигналів на хромосомі 22

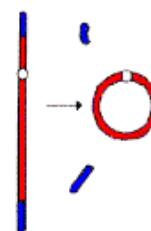


Рис. 2

Схема утворення кільцевої хромосоми

мікрodelеція 22q13.3 асоціюється із синдромом Фелан-МакДерміда (OMIM #606232). Такий тип хромосомної перебудови часто виникає як спонтанна мутація, але може з'явитися внаслідок утворення кільцевої хромосоми 22 із втратою термінальних локусів довгого плеча, і сімейних транслокацій із участю локусу q13.3 хромосоми 22 [3]. Розмір делетованого фрагменту (залежність дози генетичного продукту) і втрата критичних локусів ARSA і SHANK3 визначає клініку пацієнта [9]. Цікаво, що ген SHANK3 також асоціюється із розвитком таких хвороб, як аутизм і шизофренія, а також відповідальний за розвиток нейроповедінкових аномалій [10].

Для встановлення природи цієї перебудови діагностика завжди починається із стандартного каріотипування, як "золотого стандарту" цитогенетичної діагностики. У випадках мікрodelеції використовують молекулярно-цитогенетичні методи: флуоресцентна *in situ* гібридизація (FISH) і порівняльна геномна гібридизація (arrayCGH).

Результати й обговорення

Під час рутинного аналізу хромосом у дітей із підозрою на хромосомну патологію ми виявили два випадки кільцевої хромосоми 22. Виникла ідея об'єднати і порівняти ці два випадки, оскільки з'ясування відповідності клінічної картини пацієнта типу хромосомної перебудови необхідне для встановлення діагнозу лікарем-генетиком, розрахунку генетичного ризику та вирішення низки медично-соціальних питань для сім'ї.

Відповідно до джерел літератури клініка, обумовлена мікрodelецією 22q13, має свої особливості у вигляді м'язової гіпотонії у неонатальному періоді, порушенні координації й ходи, затримки мовного розвитку, розумової відсталості та черепно-лицевих дизморфій (мікроцефалія, епікант, великі вушні раковини). Серед поведінкових особливостей відмічають агресивну поведінку і гіперактивність, а також знижений поріг больової чутливості [11].

Диференційна діагностика цієї патології проводиться серед синдромів, які характеризуються м'язовою гіпотонією, затримкою психомовного розвитку і/або аутистичної поведінки (синдроми Прадера-Віллі, Ангельмана, Вільямса, Сміта-Магеніса, Сотоса, фрагільної хромосоми X, а також

дитячий церебральний параліч, аутизм). [11].

Пробанд №1. Пацієнта скеровано у СМГЦ у віці 3,5 років від кардіологічного центру з метою виключення хромосомної патології. Дитина народилася від другої вагітності та перших пологів (перша вагітність завмерла у 16 тижнів). Пологи були ускладненими кесаревим розтином на 41-42 тижні; вага дитини при народженні - 3800 г, зріст - 54 см, Апгар - 6/6 балів. Пренатальний генетичний скринінг у матері пробанда проводили двічі - на 10-11 та 16-18 тижні, згідно із якими вагітна не увійшла до групи ризику за хромосомною патологією.

Фенотип пробанда характеризувався лицевими дизморфіями у вигляді високого піднебіння, акромегалії, порушенням пальцевого ряду на двох ступнях, широкими дистальними фалангами пальців рук та вираженою м'язовою гіпотонією та атаксією. Патології зору і слуху не виявлено. Щодо подальшого розвитку дитини, слід зазначити, що почала тримати голову в 6 місяців, самостійно ходити у 3 роки, проте, хода була нестійкою (атаксія). У 3,5 роки пробанд не говорив, але впізнавав рідних; стояв на обліку у невропатолога за місцем проживання від 1,5 року з приводу дитячого церебрального паралічу і затримки психомовного розвитку; судом не було.

Серед інших досліджень проведено нейросонографію, де зафіксовано гідроцефалію; УЗО серця виключило наявність вроджених вад серця (ВПС) та патологій міокарда.

Пробанд №2. Скерований з регіонального медично-генетичного центру з метою уточнення діагнозу. Дитина від першої вагітності і перших пологів, народилася з вагою 2500 г і ростом - 51 см. При народженні була асфіксія і тривала жовтяниця (до 1 місяця). У неонатальному періоді виявлено ваду серця - ОАП (відкритий аортальний проток), з приводу чого дитина було оперовано.

До СМГЦ пробанд звернувся у віці 6 років, у якого не було виявлено стигм дизембріогенезу та інших вроджених вад. Дитина розвивалася з затримкою стато-кінетичного, психомовного та фізичного розвитку. На момент обстеження у пробанду був відсутній ковтальний та жувальний рефлекс. Неврологічний стан характеризувався спастичним тетрапарезом. Слід зазначити, що результати інструментальних обсте-

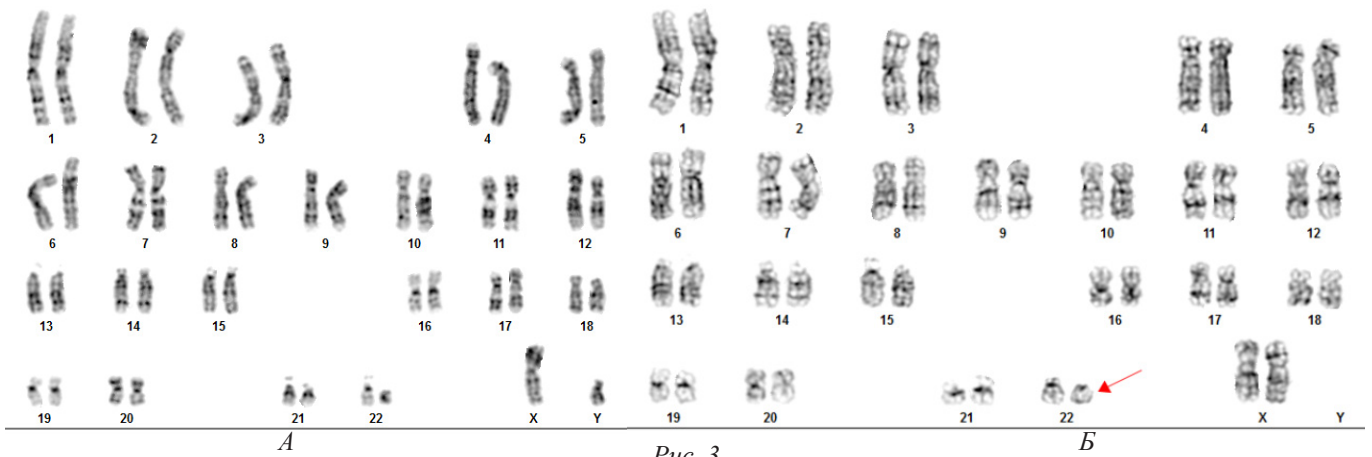


Рис. 3

Каріограма хромосом пацієнта №1(А) і пацієнта №2 (Б). Кільцева хромосома 22 вказана стрілкою. G-метод фарбування; $\times 1000$

жень (МРТ головного мозку) показали наявність гіпоплазії лобових доль та гіпоплазію мозолистого тіла. Комп'ютерна томографія виявила ознаки арахноїдальної кісти.

Батькам дитини проводили цитогенетичне дослідження, хромосомних перебудов не виявлено.

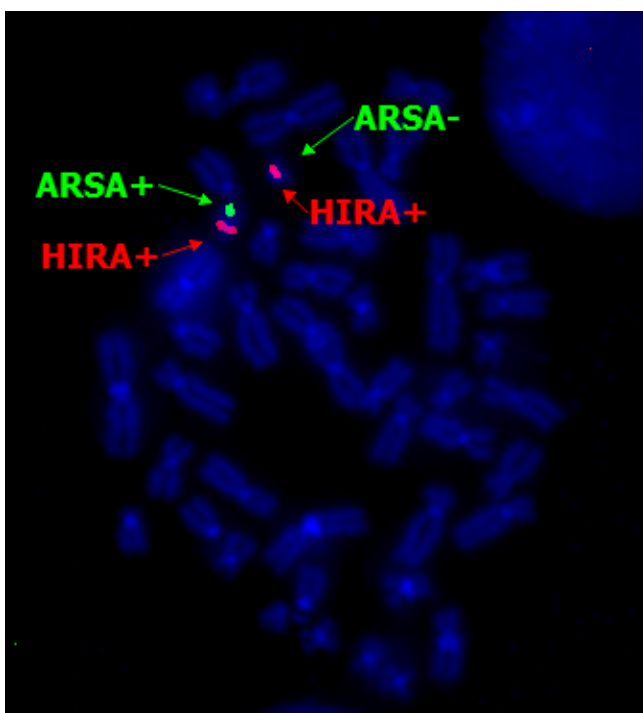
Результати цитогенетичних досліджень пробандів наведено на рис. 3.

В обох випадках проводили стандартне каріотипування, де і виявили аномальну хромосому 22 (рис 3 А, Б). Підтвердження факту утво-

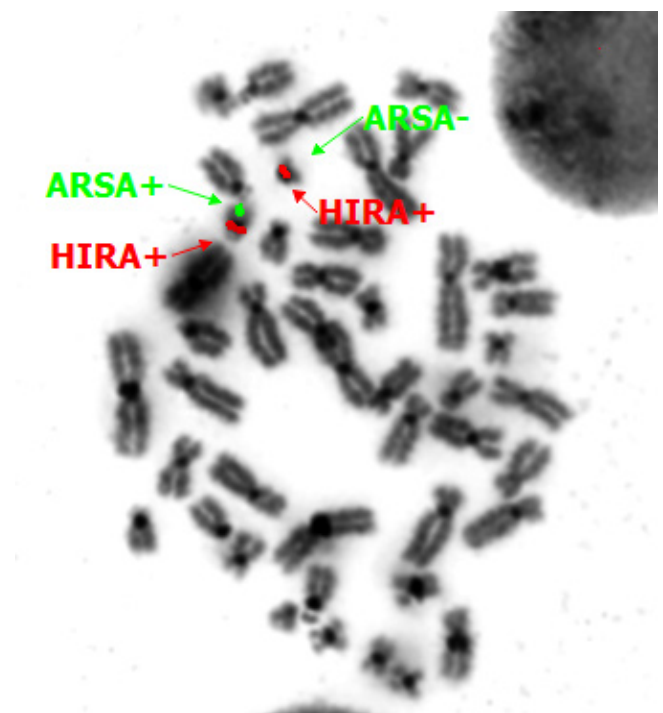
рення кільця встановлювали за допомогою FISH-методу зі застосуванням ДНК-зонду DiGeorge Region Probe: червоний сигнал представлений локусом 22q11.2 (HIRA), а зелений відповідає локусу 22q13.3 (ARSA) (рис 4 А, Б.).

Результати каріотипу і FISH-дослідження:
 - пацієнт №1 - 46,XY,r(22)(p11.1q13.3).ish 22q11.2(HIRA+), 22q13.3(ARSA-)
 - пацієнт №2 - 46,XX,r(22)(p11.1q13.3).ish 22q11.2(HIRA+), 22q13.3(ARSA-).

Червоні сигнали локусу HIRA (22q11.2) представлено на обох хромосомах 22, але зеле-



А



Б

Рис. 4

(А. Б.) FISH-ілюстрація: зображення локусів 22q11.2 (HIRA), 22q13.3 (ARSA) на хромосомі 22. А.- стандартний вигляд, Б. - інвертований FISH (фото хромосом пацієнта №2); $\times 1000$

ний сигнал, тобто локус 22q13.3, є лише на одній структурно нормальній хромосомі 22, на іншій (кільцевій) він відсутній (рис. 4). У цьому дослідженні червоне свічення виступило як позитивний контроль виконання дослідження, а зображення зеленого фільтру показало втрату субтеломерної послідовності на довгому плечі однієї хромосоми 22.

Отже, незважаючи на те, що обидва випадки мають однакову хромосомну перебудову, у описаних пробандів клінічна картина різна, немає загальних рис розвитку захворювання. Є неврологічна клініка у обох пацієнтів, груба затримка фізичного, психічного розвитку, м'язова гіпотонія і атаксія. Проте, ці ознаки притаманні багатьом хромосомним і генним синдромам, запідозрити саме патологію хромосоми 22 неможливо.

Можливо, таке розходження анамнезу обумовлене різною довжиною делетованого хромосомного фрагменту, а отже, різною кількістю втрачених генів у досліджуваному локусі, що діагностується тільки із використанням високочутливих методів дослідження. Наприклад, можна використати агауCGH (порівняльну геномну гібридизацію або молекулярне каріотипування), яка тестує всі хромосоми на наявність мікрodelецій і мікродуплікацій із точним вказанням точок локалізації. Для розшифровки первинної ДНК послідовності і пошуку точкових мутацій застосовується метод секвенування.

Висновки

1. Діти із затримкою фізичного, стато-кінетичного та психо-мовного розвитку підлягають обов'язковому стандартному каріотипуванню та, при необхідності, молекулярно-цитогенетичному дослідженню у вигляді FISH-діагностики та інших специфічних молекулярно-генетичних методів.
2. Порівнюючи висліди наведеного дослідження,

пробанди, у каріотипі яких виявлено кільцеву хромосому 22, не мали специфічних клінічних ознак.

3. Клінічні ознаки нагадують вияви, характерні при моносомії локусу 22q13.3, що у джерелах літератури описано як синдром Фелан-МакДерміда.

Література

1. H. Hannachi, S. Mougou, I. Benabdallah et al: Molecular and phenotypic characterization of ring chromosome 22 in two unrelated patients. *Cytogenet Genome Res* 2013;140:1-11.
2. Weleber RG, Hecht F, Giblett ER: Ring-G chromosome, a new G-deletion syndrome. *Am J Dis Child* 1968;115: 489-493.
3. Demirhan O, Tunc E: Phenotypic correlations in a patient with ring chromosome 22. *Indian J Hum Genet* 2010;16: 97-99.
4. Jobanputra V, Ash E, Anyane-Yeboah K, Warburton D, Levy B: Changes in an inherited ring (22) due to meiotic recombination. Implications for genetic counseling. *Am J Med Genet A* 2009;149A:1310-1314.
5. Cytogenetic methods of human chromosomes (guidelines). Kyiv, Kyiv Medical Academy of Postgraduate Education. P.L. Shupuk 2003; page 23. (Цитогенетичні методи дослідження хромосом людини (методичні рекомендації). Київ, Київська медична академія післядипломної освіти ім. П. Л. Шупика 2003; Стр 23).
6. Vysis LSI TUPLE1 (HIRA) SpectrumOrange/LSI ARSA SpectrumGreen Probe Set. Abbot Molecular Inc. Des Plaines, IL 60018 USA.
7. Baranov V.S., Kuznetsova T. B: Cytogenetics of human embryogenesis. St. Petersburg: Publishing F-L, 2007; page 88. (Баранов В. С., Кузнецова Т. В: Цитогенетика ембрионального розвитку человека. СПб: Издательство Р-Л, 2007; Стр 88.)
8. Lam ACF, Lai KKS, Lam STS: Distinctive phenotype in a case of ring chromosome 22 with features of 22q13.3 deletion syndrome. *Paediatrics*; 2006, 11: 317-319.
9. Shcheglovitov A et al.: SHANK3 and IGF1 restore synaptic deficits in neurons from 22q13 deletion syndrome patients. *Nature*; 2013,503: 267-71.
10. Gauthier et al.: De novo mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 in patients ascertained for schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010,107 (17): 7863-8.
11. Phelan MC, McDermid HE: The 22q13.3 Deletion Syndrome (Phelan-McDermid Syndrome). *Mol Syndromol.* 2011;2 (1): 186-201.