

Биология

УДК 575.1:616-007-07

М. С. МАНВЕЛЯН

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА FISH (FLUORESCENCE *IN SITU*
HYBRIDIZATION) В ПРЕНАТАЛЬНОЙ И ПОСТНАТАЛЬНОЙ
ДИАГНОСТИКЕ ХРОМОСОМНЫХ АНОМАЛИЙ

Впервые в Армении был применен молекулярно-цитогенетический метод флюоресцентной *in situ* гибридизации (FISH – fluorescence *in situ* hybridization) в пренатальной и постнатальной цитогенетике у 30 пациентов с различными формами хромосомной патологии. Внедрение метода FISH в цитогенетическую практику Армении существенно повысило эффективность диагностики хромосомных аномалий.

Введение. В цитогенетической практике часто встречаются хромосомные аномалии, диагностика которых находится за пределами разрешающей способности классических методов. Достижения в этой области в последнее десятилетие привели к формированию принципиально нового метода изучения хромосом – флюоресцентной *in situ* гибридизации (FISH – fluorescence *in situ* hybridization) [1, 2]. Основан он на использовании в реакции гибридизации *in situ* различных клонированных фрагментов ДНК человека (ДНК-зондов), которые в фиксированных препаратах связываются со строго определенными районами хромосом [3].

Существуют следующие группы ДНК-зондов.

1. Ген-специфичные, связывающиеся с определенными последовательностями нуклеиновых кислот в хромосоме.

2. ДНК-зонды, связывающиеся с регионами, богатыми последовательностями повторяющихся пар оснований (центромерные и теломерные зонды).

3. ДНК-зонды, окрашивающие или всю хромосому (WCP – whole-chromosome painting probes), или отдельное ее плечо (chromosome-arm-painting probes) [4].

В клинической цитогенетике часто используются центромерные ДНК-зонды, позволяющие эффективно выявлять наиболее распространенные хромосомные патологии, такие, как синдромы Дауна, Патау, Эдвардса, Клайнфельтера, Тернера и др. [2]. Молекулярно-цитогенетический ме-

тод FISH применяется для выявления микроструктурных хромосомных аномалий, сложных хромосомных перестроек, затрагивающих более двух хромосом, идентификации маркерных хромосом, выявления точного процента мозаицизма, а также случаев сложного хромосомного мозаицизма с небольшим клоном аномальных клеток [1, 2]. Интерфазный FISH является эффективным методом в пренатальной диагностике для выявления анеуплоидий без культивации клеток. Если период, необходимый для культивации клеток амниотической жидкости и ворсин хориона, обычно длится около 2–3 недель, то, благодаря проведению интерфазного метода FISH в некультивируемых клетках ворсинчатого хориона и амниоцитах, срок, необходимый для проведения анализа, сокращается до 48 часов [2, 5–7].

Материалы и методы. В Республиканской медико-генетической консультации (НИЦ охраны здоровья матери и ребенка) диагностика хромосомных аномалий выполнялась классическими методами цитогенетического анализа. Лимфоциты периферической крови культивировались по общепринятой методике (Hungerford D.A.) с использованием дифференциальных методов окраски хромосом G- и C-banding. Биопсия хориона (БХ) проводилась при нормально протекающей беременности на сроке 9 недель под контролем УЗИ, в частности с определением сердцебиения плода (до и после БХ), локализации, толщины и расстояния хориона от внутреннего зева шейки матки. Хориональная ткань в количестве 5 мг была получена через цервикальный канал биопсийными щипцами. Обработка и приготовление препаратов ворсинчатого хориона проводились «прямым» методом по соответствующему протоколу [7]. Амниоцентез выполнялся при нормально протекающей беременности на сроке 17 недель под контролем УЗИ с определением локализации плаценты и сердцебиения плода. Образец амниотической жидкости (АЖ) был аспирирован шприцем трансабдоминально в количестве 5 мл. Обработка АЖ и приготовление препаратов некультивируемых амниоцитов проводились по соответствующему протоколу [5].

Диагностика хромосомных аномалий методом FISH выполнялась на кафедре генетики и цитологии биологического факультета ЕГУ с использованием home-made ДНК-зондов, полученных из трансгенных бактериальных штаммов со встроенным участком ДНК человека (University of Bari, Italy), и коммерческих ДНК-зондов (Vysis, Inc., Downers Grove, IL, USA). Были использованы локус-специфичные, центромерные, субтеломерные ДНК-зонды, а также ДНК-зонды раскраски хромосом. Метод FISH включал этапы предобработки препарата, гибридизации, постгибридизационной промывки и дополнительный этап для ДНК-зондов собственного изготовления – гаптенную реакцию. Предобработка включала этап обработки раствором пепсина, раствором формальдегида, а также серию обработок этанолом. После нанесения соответствующего зонда и реакции денатурации при 73°C препараты были инкубированы на ночь при 37°C. Дальнейшая обработка включала постгибридизационную промывку. Для гаптенной реакции на препараты был нанесен Anti-Dig родамин. Препараты окра-

шивались DAPI II. Анализ проводился с помощью флюоресцентного микроскопа со встроенными в него тремя фильтрами (Zeiss) и компьютерной системы ISIS (MetaSystems). Часть работы нами была выполнена в Институте медицинской генетики (Университет г. Цюриха).

Результаты и обсуждения. Молекулярно-цитогенетический метод FISH был применен в пренатальной и постнатальной диагностике 30 пациентов с различными формами хромосомной патологии.

Постнатальная диагностика проводилась методом FISH у пациентов с множественными врожденными пороками развития (МВПР), отягощенным акушерским анамнезом (многократные спонтанные аборт, мертворождения, рождение детей с врожденными пороками развития), нарушением репродуктивной системы неясного генеза у мужчин и женщин (первичная аменорея, бесплодный брак и др.), существенной задержкой умственного и физического развития у ребенка. Флюоресцентная *in situ* гибридизация проводилась после классических методов цитогенетического анализа в целях верификации диагноза, уточнения хромосомной патологии, выяснения происхождения маркерных хромосом, выявления низкого уровня мозаицизма и установления его точного процентного соотношения. Опишем несколько случаев проведенной нами постнатальной диагностики хромосомных аномалий с применением молекулярно-цитогенетического метода FISH.

Случай 1. У пациентки с первичной аменореей методом дифференциальной окраски хромосом G-banding была выявлена мозаичная форма синдрома Тернера 45,X/46,X+mar. Для идентификации маркерной хромосомы нами использован метод FISH с применением центромерных зондов для X и Y хромосом. В результате было показано происхождение маркерной хромосомы от Y хромосомы с выявлением кариотипа 45,X/46,X,invdupY. У 15–20% пациентов с мозаицизмом 45,X/46,XY встречаются гонадобластомы, развивающиеся в первые 2 десятилетия жизни. В связи с этим лицам с данным кариотипом показано удаление половых желез. Таким образом, из-за высокого риска новообразований необходимо дифференцировать больных с кариотипом 45,X/46,XY от больных, не имеющих Y хромосому. Это указывает на высокую значимость метода FISH для точной и своевременной постановки диагноза

Случай 2. Методом дифференциальной окраски хромосом G-banding у пациентки был выявлен синдром «кошачьего крика» с кариотипом 46,XX,del(5)(p15.2). Впоследствии проведен метод FISH с использованием ДНК-зонда участка 5p15.2 и в 15% клеток определен нормальный кариотип, т.е. мозаичная форма синдрома «кошачьего крика» с небольшим клоном здоровых клеток. Это позволило объяснить относительно высокий уровень умственного и физического развития у пациентки по сравнению с клинической картиной, наблюдаемой при полной форме синдрома «кошачьего крика». Данный пример указывает на высокую эффективность метода FISH в выявлении низкого уровня мозаицизма.

Случай 3. У пациентки с более 40 выкидышами методом дифферен-

циальной окраски хромосом G-banding был выявлен кариотип 45,XX,+t(14q;14q). Для верификации диагноза нами проведен метод FISH с использованием ДНК-зонда WCP для 14-ой хромосомы. Диагноз, поставленный классическими методами цитогенетического анализа, подтвердился, что указывает на 100%-ую вероятность выкидышей у пациентки.

Случаи 4 и 5. У двух пациентов методом дифференциальной окраски хромосом G-banding был выявлен синдром XX мужчин. Для идентификации участка, определяющего пол (SR_Y – sex determining region of Y chromosome), который не выявляется классическими методами цитогенетического анализа, нами проведен метод FISH с использованием центрального ДНК-зонда для X хромосомы и ДНК-зонда участка SR_Y. В результате, в одном случае выявлена транслокация участка SR_Y на одну из X хромосом, а в другом – определено отсутствие данного участка на X хромосомах и аутосомах. Таким образом, после классических методов цитогенетического анализа необходимо проводить метод FISH в целях полной диагностики синдрома XX мужчин и правильной организации дальнейшей врачебной помощи пациенту.

Пренатальная диагностика молекулярно-цитогенетическим методом FISH нами была проведена в интерфазных ядрах «прямых» препаратов ворсинчатого хориона и амниоцитов у двух пациенток с высоким уровнем генетического риска по рождению ребенка с трисомией по 21-ой хромосоме.

Случай 1. В анамнезе пациентки – ребенок с транслокационной формой синдрома Дауна и кариотипом 46,XY,-14,+t(14q;21q). Отец ребенка – носитель сбалансированной робертсоновской транслокации 45,XY,-14,-21,+t(14q;21q). В «прямых» препаратах ворсинчатого хориона был проведен метод FISH с использованием ДНК-зонда участка 21q22.3. В результате в 100 интерфазных ядрах ворсинчатого хориона выявлено по 2 сигнала данного участка с исключением трисомии по 21-ой хромосоме у плода. Течение беременности нормальное. В срок родился мальчик без фенотипических отклонений.

Случай 2. В анамнезе у женщины – 7 беременностей: девочка с синдромом Дауна и кариотипом 47,XX+21; мальчик с МВПР скончался через 4 дня после рождения; 3 самопроизвольных выкидыша на сроке 12 недель беременности. Шестая по счету беременность завершилась рождением девочки с синдромом Дауна и кариотипом 47,XX+21. Соматический статус и фенотип родителей нормальны. Настоящая беременность – седьмая. Анамнез пациентки послужил основанием для проведения амниоцентеза. В «прямых» препаратах амниоцитов был проведен интерфазный метод FISH с использованием ДНК-зонда для 21-ой хромосомы участка 21q22.13 – q22.2. Проанализировано 100 интерфазных клеток. Из них в 70% выявлено по 3 копии 21-ой хромосомы, а в 30% – по 2 копии, т.е. была диагностирована мозаичная форма синдрома Дауна. Длительность цитогенетической диагностики, начиная с момента амниоцентеза, составила 3 дня. С согласия пациентки произведено искусственное прерывание бере-

менности. Трисомия по 21-ой хромосоме была верифицирована интерфазным методом FISH в клетках ворсинчатого хориона абортного материала. Проанализировано 200 клеток.

До наступления шестой беременности классическими методами цитогенетического анализа определен кариотип родителей, который соответствовал 46,XX и 46,XY. В дальнейшем применена флюоресцентная *in situ* гибридизация, которая исключила у родителей наличие скрытого мозаицизма по трисомному клону в лимфоцитах периферической крови.

Применение метода FISH в цитогенетической практике позволило нам:

– идентифицировать структурные хромосомные аномалии (сложные перестройки, затрагивающие более двух хромосом, маркерные хромосомы, изохромосомы и др.), диагностика которых находится за пределами разрешающей способности классических методов цитогенетического анализа;

– определить анеуплоидию в неделящихся пренатальных и постнатальных клетках. Интерфазный метод FISH позволил выявить случаи с низким уровнем мозаицизма, установить точный уровень мозаицизма, а также поставить диагноз в случаях неудовлетворительного митотического индекса и качества метафаз в «прямых» препаратах;

– значительно сократить срок цитогенетической диагностики (2–3 дня вместо 2–3 недель при методе культивации), что особенно важно в пренатальной медицине для своевременного принятия решения о сохранении беременности;

– использовать небольшое количество биоматериала для проведения пренатальной диагностики, что значительно снижает риск осложнения беременности после проведения соответствующих инвазивных процедур.

Таким образом, внедрение молекулярно-цитогенетического метода FISH в цитогенетическую практику Армении существенно повысило эффективность диагностики хромосомных аномалий.

Автор выражает благодарность Швейцарскому национальному научному фонду и М. Роччи (University of Bari, Italy) за содействие, оказанное в проведении работы.

Кафедра генетики и цитологии

Поступила 22.10.2003

ЛИТЕРАТУРА

1. Бочков Н.П. Клиническая генетика. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001, с. 247–272.
2. Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б., Соловьев И.В., Демидова И.А., Шаронин В.О., Вехова Н.В., Берешева А.К., Мале П., Жиолант М., Колотий А.Д., Кравец В.С., Казанцева Л.З., Ройзес Ж. – Российский вестник перинатологии и педиатрии, 1998, № 1, с. 31–36.
3. Горин В.С., Серов В.Н., Жабин С.Г., Маркдорф А.Г., Шин А.П., Горин Р.В. – Проблемы репродукции, 2000, № 2.
4. Nicole McNeil and Thomas Ried Novel molecular cytogenetic techniques for identifying complex chromosomal rearrangements: technology and application in molecular medicine. Expert reviews in molecular medicine, 2000.
5. Bernd Eiben, Witold Trawicki, Wilhelm Hammans, Richard Goebel, Jörg T. Epplen – Prenat. Diagn, 1998, v. 18, p. 901–906.

6. Bernd Eiben, Witold Trawicki, Wilhelm Hammans, Richard Goebel, Michael Pruggmayer, Jörg T. Epplen – *Fetal Diagn Ther.* 1999, v. 14, p. 193–197.
7. Bryndorf T., Christensen B., Vad M., Parner J., Carelli M.P., Ward B.E., Klinger K.W., Bang J., Philip J. – *Am. J. Hum. Genet.* 1996, v. 59, p. 918–926.

Մ. Ս. ՄԱՆՎԵԼՅԱՆ

ՆԱԽԱԾՆՆԴՅԱՆ ԵՎ ՀԵՏԾՆՆԴՅԱՆ ՇՐՋԱՆՈՒՄ ԶՐՈՍՏՈՍԱՅԻՆ
ԽԱԹԱՐՈՒՄՆԵՐԻ ԱԵՏՈՐՈՇՈՒՄԸ FISH (FLUORESCENCE *IN SITU*
HYBRIDIZATION) ԵՂԱՆԱԿԻ ԿԻՐԱՌՄԱՍԲ

Ամփոփում

Հայաստանում առաջին անգամ կիրառվել է մոլեկուլային-բջջագենետիկական FISH (fluorescence *in situ* hybridization) մեթոդը 30 հիվանդների նախածննդյան և հետծննդյան շրջանում քրոմոսոմային տարբեր բնույթի խաթարումները ախտորոշելու համար: FISH եղանակի կիրառումը Հայաստանի բջջագենետիկական պրակտիկայում բարձացրել է քրոմոսոմային խաթարումների ախտորոշման արդյունավետությունը:

M. S. MANVELYAN

APPLICATION OF METHOD FISH (FLUORESCENCE *IN SITU*
HYBRIDIZATION) IN PRENATAL AND POSTNATAL DIAGNOSTICS OF
CHROMOSOMAL ANOMALIES

Summary

For the first time the molecular-cytogenetic method of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was widely used in Armenia in prenatal and postnatal diagnostics of 30 patients with different forms of chromosomal pathology. Application of FISH method in cytogenetic practice of Armenia increased the efficiency of diagnostics of chromosomal anomalies.