

УДК 616.89; 575.113; 575.116; 159.973

МОЛЕКУЛЯРНОЕ КАРИОТИПИРОВАНИЕ ДЕТЕЙ С УМСТВЕННОЙ ОТСТАЛОСТЬЮ И АУТИЗМОМ

^{1,2,3}Юров И.Ю., ^{1,2,4}Ворсанова С.Г., ^{1,2,4}Куринная О.С., ^{1,2}Зеленова М.А., ^{1,2,4}Юров Ю.Б.

¹ФГБУ «Научный центр психического здоровья РАМН» Российской академии
медицинских наук, Москва;

²Обособленное структурное подразделение ГБОУ ВПО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова»
«Научно-исследовательский клинический институт педиатрии» Минздрава России, Москва;

³Российская медицинская академия последипломного образования, Москва;

⁴Московский городской психолого-педагогический университет,
Москва, e-mail: ivan.iourov@gmail.com

В настоящей работе с помощью классических цитогенетических методов G- и C-окрашивания были исследованы образцы лимфоцитов периферической крови у 115 детей с умственной отсталостью, врожденными пороками развития и аутизмом. Кроме того, в этой группе детей были исследованы несбалансированные геномные вариации с помощью молекулярного кариотипирования. Пациенты, у которых выявлялись потери генетического материала, были также обследованы с помощью флюоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Обнаружено 8 численных и структурных хромосомных перестроек (7%), причём в пяти из них выявлены дополнительные геномные нарушения. Помимо этого, дальнейшие исследования с помощью оригинальной биоинформатической технологии позволили в 55 случаях (48%) определить патогенетические процессы, связанные с вышеуказанными клиническими проявлениями. В 22 случаях (19%) геномных аномалий обнаружено не было. В результате был сделан вывод о том, что эффективность использованной технологии в наших случаях составляет не менее 80%. Таким образом, было продемонстрировано, что сочетание молекулярного кариотипирования и биоинформатических технологий обладает высокой эффективностью для выявления геномной патологии и определения молекулярных механизмов нарушения при умственной отсталости и аутизме. Тем не менее следует отметить, что цитогенетические исследования всё же являются необходимыми при проведении диагностики геномной патологии, даже несмотря на возможность использования методов молекулярного кариотипирования.

Ключевые слова: цитогенетические исследования, полногеномное сканирование, молекулярное кариотипирование, умственная отсталость, аутизм

MOLECULAR KARYOTYPING IN CHILDREN WITH MENTAL RETARDATION AND AUTISM

^{1,2,3}Iourov I.Y., ^{1,2,4}Vorsanova S.G., ^{1,2,4}Kurinnaia O.S., ^{1,2}Zelenova M.A., ^{1,2,4}Yurov Y.B.

¹Mental Health Research Center of Russian Academy of Medical Sciences, Moscow;

²Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Separated Structural
Unit «Clinical Research Institute of Pediatrics», Ministry of Health of Russian Federation, Moscow;

³Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow;

⁴Moscow State University of Psychology and Education, Moscow, e-mail: ivan.iourov@gmail.com

In the present paper we report a study of peripheral blood lymphocytes samples in 115 children with mental retardation, congenital malformations and autism by cytogenetic methods of G- and C-banding. Unbalanced genomic variations were investigated by molecular karyotyping. Patients presented with the loss of genetic material were also examined using fluorescent *in situ* hybridization (FISH). We detected 8 numerical and structural chromosomal rearrangements (7%), and in five of these cases additional types of genomic aberrations were identified. Further studies using original bioinformatic technologies have allowed us to determine the pathogenic aberrations relevant to clinical features in 55 cases (48%). Twenty two cases (19%) did not demonstrate genomic abnormalities. Considering these data, it was concluded that the effectiveness of the technology used in our research is about 80%. Thus, it was demonstrated that the combination of molecular karyotyping and bioinformatic technologies is highly effective for the detection of genomic pathology and determining the molecular mechanisms of mental retardation and autism. Nevertheless, it should be noted that cytogenetic studies are still necessary for detecting genomic pathology in addition to molecular karyotyping.

Keywords: cytogenetic analysis, whole genome scan, molecular karyotyping, mental retardation, autism

Хромосомные аномалии и геномные перестройки являются наиболее частой формой генетической патологии, ассоциированной с умственной отсталостью и аутизмом. В последнее десятилетие наблюдается рост числа сообщений о вкладе геномных и хромосомных микроперестро-

ек и вариаций числа копий последовательности ДНК (copy number variations – CNV) в патогенез умственной отсталости и аутизма [1, 4–10, 15]. Это, по-видимому, связано с активным внедрением технологии сканирования генома при использовании метода молекулярного кариотипирования, который

может позволить оценить вариабельность генома с беспрецедентно высоким разрешением (до 1 тыс. пн и более) [2–4, 6, 10, 13, 14]. Суммирование нами полученных данных позволило выдвинуть рекомендации для выявления несбалансированных геномных перестроек, которые предлагают использовать такие методы полногеномного сканирования, как молекулярное кариотипирование, в качестве основного для генетической диагностики [2, 6, 9, 13]. Ранее показано, что в группах детей с умственной отсталостью и/или аутизмом подобные формы вариаций генома выявляются до 37% случаев при использовании дополнительных биоинформатических методов для оценки влияния геномных перестроек на фенотип [2, 6, 14]. Последнее является особо актуальным, поскольку CNV могут как нести функциональные последствия, так и быть непатогенными [1, 3, 4, 8, 10, 13, 14].

Целью нашего исследования была оценка диагностической технологии молекулярного кариотипирования в сочетании с оригинальным биоинформатическим методом для выявления геномной патологии в группе детей с умственной отсталостью и аутизмом.

Материал и методы исследования

С помощью классических цитогенетических методов G- и C-окрашивания [11, 12] были исследованы образцы лимфоцитов периферической крови у 115 детей с умственной отсталостью, аутизмом и/или врожденными пороками развития. Методом

молекулярного кариотипирования (array CGH) были исследованы несбалансированные геномные вариации в соответствии с ранее описанными протоколами [6, 7]. Для проведения исследования методом array CGH использовалась платформа, содержащая около 2,7 млн проб. Пациенты, у которых выявлялись потери генетического материала, были также обследованы с помощью флюоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) [11, 12, 15]. Помимо этого, все обнаруженные вариации генома для оценки их влияния на фенотип анализировались с помощью оригинальной биоинформатической технологии, описанной в предыдущих работах [6].

Результаты исследования и их обсуждение

В работе обследовано 115 детей, средний возраст которых составлял 5 лет 3 месяца (от 9 мес. до 17 лет), вышеперечисленными методами. Цитогенетический анализ позволил выявить 8 численных и структурных аномалий хромосом, причём в пяти из них выявлены какие-либо геномные нарушения при применении метода молекулярного кариотипирования. В 22 случаях не обнаружено никаких геномных аномалий. Исползованная технология сканирования генома дала возможность охарактеризовать геномные перестройки с точностью до нескольких десятков нуклеотидов, а также выявить CNV и потери гетерозиготности, которые произошли за счет делеций. Все случаи хромосомных аномалий были подтверждены методом FISH. Полученные результаты представлены в таблице.

Результаты цитогенетического (кариотипирование) и молекулярно-цитогенетического (молекулярное кариотипирование – array CGH) исследований у детей с умственной отсталостью, врожденными пороками развития и аутизмом

№ п/п	Возраст	Результаты цитогенетического исследования (кариотипирование)	Аномалии, выявленные после проведения молекулярного кариотипирования (array CGH)
1	2	3	4
1	4 года	46,XX,del(6)(q11q14)	Делеция 6q11.1q14.1
2	9 мес.	46,XY,?del(1)(pter → p32.3::32.1 → qter),9phqh	Делеция 1p32.1p31.1
3	2 года	46,XX,add(8)(p23)	Делеция 8p23.3p23.1; Дупликация 8p23.1p11.22
4	4 года	47,XX,+mar,13pss	Мозаичная дупликация 17p11.2q11.1; CNV 8q24.3, 17p11.2, 19q13.41
5	8 лет	46,XX,del(8)(p23.1)[10]/46,XX[7]	Делеция 8p23.3p23.1; CNV 2q24.3
6	9 мес.	47,XXX	Трисомия хромосомы X; CNV 7q34, 19p13.2; Интрагенные перестройки 8p23.1, 11q11.21
7	9,5 лет	46,X,+mar(delY)	Материал одной хромосомы X при наличии материала хромосомы Yp11.31q11.21; CNV 9q34.3; Интрагенная перестройка 1q43
8	8 лет	46,XY,del(7)(q)	Делеция 7q32.3q35; Интрагенная перестройка 2q31.1

Продолжение таблицы

1	2	3	4
9	1 год 7 мес.	46,XX	Микроделеция 1p36.33p36.23
10	9 лет	46,XY,1qh-	Микроделеция 6p11.2
11	6 лет	46,XY,9qh+	Микроделеция 9q21.13; CNV 7q21.2
12	5 лет	45,X,22ps+[2] / 46,XY,22ps+[18]	Микроделеция Yq11.23 CNV Xp22.33, 16p13.3, 19q13.33
13	2 года 1 мес.	46,XY,9phqh	Микроделеция Yq11.23; CNV Xp22.33, Xp22.33, Xq28, 5q35.2
14	7 лет	46,XY,9phqh,21ps+	Микроделеция 16p11.2; CNV Xp22.33
15	2 года 2 мес.	46,XX,15cenh+	Микродупликация 17p13.3 Микроделеция 19p13.3 CNV 5q22.2, 7p12.3
16	6 лет	46,XY.15cenh+	Мозаичная микродупликация 11p14.3 CNV Yq11.23, 13q34
17	11 лет	46,XY	Микроделеция 15q11.2q13.1; CNV 6q22.31, 9q21.11
18	1 год 2 мес.	46, XX,1phqh,9qh+, 15cenh+	Микроделеция 16p12.1; CNV 10p13, 17q25.3; Интрагенная перестройка Xq28
19	10 лет	46,XX	Микроделеция Xq21.1; CNV Xq13.1, Xq28; Интрагенные перестройки 2q23.1,3p22.3
20	13 лет	46,XY,9phqh,21ps+	Микродупликации Yq11.223, Yq11.223q11.23; CNV 19q13.2; Интрагенные перестройки 2q22.1, 13q12.12, 13q33.3
21	3 года 7 мес.	46,XY,16qh+	Микродупликация Yq11.223q11.23; CNV Xq13.3, 7p13, 8p23.1; Интрагенные перестройки Xp11.23, 2p13.1, 5p15.33
22	4 года 4 мес.	46,XY,22pss	Микродупликация Yq11.223q11.23; CNV Xp11.3, 7p22.1 Интрагенные перестройки Xp22.2, 8q22.1
23	3 года	46,XX	Мозаичная микроделеция 2q23.3q24.2; CNV Yq11.223 Интрагенная перестройка 3q21.3
24	6 лет	46,XX	Микроделеция Xp22.12; CNV 6p21.33, 10p13 Интрагенные перестройки 1q41, 4q35.1
25	3 года	46,XY	Мозаичная микроделеция 5q14.3q15; CNV 5q35.3 Интрагенные перестройки 1q23.2, 2q33.1
26	8 лет	46,XY	Микродупликация 12p13.31; CNV 7q11.21 Интрагенная перестройка 15q26.3
27	1 год 2 мес.	45,X[2]/46,XY[28]	Микродупликация 5p13.3p13.2; CNV 2q31.1 Интрагенные перестройки Xp11.4, 4p16.3
28	4 года	46,XY	Микроделеция Yq11.23; CNV Xq28; Потеря гетерозиготности 15q11.2
29-39	10 мес. – 13 лет (средний: 4 года)	46,XX или 46,XY	CNV в различных участках хромо- сом X, 1, 2, 4, 7, 8, 9, 14, 16, 19, 22

Окончание таблицы

1	2	3	4
40–81	13 мес. – 12 лет 8 мес. (средний: 5 лет 4 мес.)	46,XX или 46,XY	Сочетание CNV в различных участках всех хромосом, кроме хромосомы 2 и 13, и инtragenных перестроек в различных участках всех хромосом, кроме Y, 8, 18, 19, 20
82	1 год 7 мес.	46,XX	CNV 1p34.3, 19q13.33 Инtragenные перестройки Xp11.2, 12q21.2, 14q22.1, 15q15.2 Потеря гетерозиготности Xq23q26.3, 1p31.1p22.3, 1q43q44, 2p25.2p24.3, 3p23p22.2, 4q22.1q26, 4q34.3q35.2, 5q33.3q35.1, 9q21.11q21.13, 9q21.31q21.33, 12q21.1q22
83–89	11 мес. – 5 лет (средний: 2 года 9 мес.)	46,XX или 46,XY	Инtragenные перестройки в различных участках хромосом X, 1, 9, 11, 13, 17, 22
90–91	5–9 лет (средний: 7 лет)	46,XX или 46,XY	Сочетание инtragenных перестроек в различных участках хромосом 1, 5, 11, 14 и потери гетерозиготности в хромосоме 11
92	1 год 10 мес.	46,XX,9phqh	Потеря гетерозиготности Xp11.4p11.1, Xq11.1q13.1, 2p12p11.2, 9q22.32q31.2, 9q33.1q34.3, 14q31.3q32.12, 17q25.1q25.3, 21q22.2q22.3

Комментируя таблицу, следует привести число пациентов с различными аномалиями генома: у трех пациентов выявлены цитогенетическими методами аномалии хромосом (размер более 5 млн пн); у двух пациентов – сочетание цитогенетически видимой аномалии и CNV; у двух пациентов – сочетание цитогенетически видимой аномалии, CNV и инtragenных вариаций числа копий ДНК; у одного ребёнка – сочетание цитогенетически видимой аномалии и инtragenных вариаций числа копий ДНК; у двух детей – субмикроскопические аномалии генома; у семи пациентов – сочетание субмикроскопических аномалий и CNV; у десяти детей – сочетание субмикроскопических аномалий, CNV и инtragenных вариаций числа копий ДНК; у одного пациента – сочетание субмикроскопической перестройки, CNV, инtragenных вариаций числа копий ДНК и потери гетерозиготности; у одиннадцати пациентов выявили CNV; у сорока двух пациентов – сочетание CNV и инtragenных вариаций числа копий ДНК; у одного ребёнка – сочетание CNV, инtragenных вариаций числа копий ДНК и потери гетерозиготности; у семи пациентов – инtragenные вариации числа копий ДНК; у двух пациентов – сочетание инtragenных вариаций числа копий ДНК и потери гете-

розиготности; у одного пациента – потеря гетерозиготности; у двадцати двух пациентов не было выявлено нарушений методом агау CGH.

Полученные данные свидетельствуют о том, что использование метода высокоразрешающей CGH на биочипах (агау CGH) представляет собой наиболее эффективный способ детекции геномных и хромосомных перестроек в группе детей с умственной отсталостью, аутизмом и врожденными пороками развития. Важно отметить, что цитогенетический анализ позволил выявить только делеции и дупликации, размер которых превышал 5 млн пн. Наиболее эффективным с точки зрения диагностики является метод агау CGH. Это коррелирует с ранее полученными данными относительно исследований с применением полногеномного сканирования [2–4, 6, 8–10, 14]. Помимо этого, полученные данные позволили сделать вывод о том, что сочетание молекулярного кариотипирования и биоинформатических технологий обладает высокой эффективностью для выявления геномной патологии и определения молекулярных механизмов нарушения при умственной отсталости и аутизме. Следует отметить, что цитогенетические исследования являются тем не

менее, необходимыми до проведения молекулярного кариотипирования.

Заключение

Анализ результатов нашего исследования показал, что для высокоэффективной диагностики следует использовать высокоразрешающий метод CGH на биочипах (аггау CGH), поскольку он не только увеличивает эффективность молекулярной диагностики, но и позволяет определить последовательности ДНК, вовлечённые в перестройки. Примечательно, что обнаруженные геномные перестройки были подтверждены методом флюоресцентной гибридизации *in situ*. Метод аггау CGH позволил охарактеризовать потерю генетического материала при микроделециях и микродупликациях с высокой точностью. Учитывая возможное развитие молекулярной терапии, полученная информация может послужить в скором времени основой для разработки тактики научно обоснованного лечения геномных заболеваний. Суммируя полученные данные, авторами был сделан вывод о том, что молекулярная диагностика требует использования таких инновационных молекулярно-цитогенетических технологий, как аггау CGH, и, несмотря на то, что технологии высокоразрешающей молекулярно-цитогенетической диагностики сравнительно недавно начали внедряться в медико-генетическую практику, за ними будущее.

Исследование выполнено за счет гранта Российского Научного Фонда (проект № 14-15-00411).

Список литературы

1. Ворсанова С.Г., Юров И.Ю., Соловьев И.В., Юров Ю.Б. Гетерохроматиновые районы хромосом человека: клинико-биологические аспекты. – М.: Медпрактика, 2008. – 300 с.
2. Ворсанова С.Г., Юров И.Ю., Куринная О.С. и др. Геномные аномалии у детей с умственной отсталостью и аутизмом: использование технологии сравнительной геномной гибридизации на хромосомах *in situ* (HRCGH) и молекулярного кариотипирования на ДНК микроматрицах (аггау CGH) // Журнал Неврологии и Психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2013. – № 8. – С. 46–49.
3. Юров И.Ю., Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б. Современные достижения в молекулярно-цитогенетической диагностике наследственных болезней (лекция) // Клиническая и Лабораторная Диагностика. – 2005. – № 11. – С. 21–29.
4. Edlmann L, Hirschhorn K. Clinical utility of array CGH for the detection of chromosomal imbalances associated with mental retardation and multiple congenital anomalies // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2009. – Vol. 1151. – P. 157–166.
5. Iourov IY, Yurov YB, Vorsanova SG. Mosaic X chromosome aneuploidy can help to explain the male-to-female ratio in autism // Med. Hypotheses. – 2008. – Vol. 70(№ 2). – P. 456.
6. Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Kurinnaia O.S. et al. Molecular karyotyping by array CGH in a Russian cohort of children with intellectual disability, autism, epilepsy and congenital anomalies // Mol. Cytogenet. – 2012. – Vol. 5. – P. 46.
7. Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Voinova V.Y., et al. Xq28 (MECP2) microdeletions are common in mutation-negative females with Rett syndrome and cause mild subtypes of the disease // Mol. Cytogenet. – 2013. – Vol. 6. – P.53.
8. Park S.J., Jung E.H., Ryu R.S. et al. The clinical application of array CGH for the detection of chromosomal defects in 20,126 unselected newborns // Mol. Cytogenet. – 2013. – Vol. 6. – P. 21.
9. Slavotinek A.M. Novel microdeletion syndromes detected by chromosome microarrays // Hum Genet. – 2008. – Vol. 124(№ 1). – P. 1–17.
10. Spreiz A., Haberlandt E., Baumann M. et al. Chromosomal microaberrations in patients with epilepsy, intellectual disability, and congenital anomalies // Clin. Genet. – 2014. – Vol.86(№ 4). – P. 361–366.
11. Vorsanova S.G., Iourov I.Y., Beresheva A.K., Demidova I.A., Monakhov V.V., Kravets V.S., Bartseva O.B., Goyko E.A., Soloviev I.V., Yurov Y.B. Non-disjunction of chromosome 21, alphoid DNA variation, and sociogenetic features of Down syndrome // Tsitologiya i Genetika. – 2005. – T.39(№ 6). – С. 30–36.
12. Vorsanova S.G., Yurov I.Y., Demidova I.A. et al. Variability in the heterochromatin regions of the chromosomes and chromosomal anomalies in children with autism: identification of genetic markers of autistic spectrum disorders. // Neurosci. Behav. Physiol. – 2007. – Vol. 37, № 6. – P. 553–558.
13. Vorsanova S.G., Yurov Y.B., Soloviev I.V., Iourov I.Y. Molecular cytogenetic diagnosis and somatic genome variations // Curr. Genomics. – 2010. – Vol.11, № 6. – P. 440–446.
14. Xu F., Li L., Schulz V.P., et al. Cytogenomic mapping and bioinformatic mining reveal interacting brain expressed genes for intellectual disability // Mol. Cytogenet. – 2014. – Vol. 7. – P. 4.
15. Yurov Y.B., Vorsanova S.G., Iourov I.Y. et al. Unexplained autism is frequently associated with low-level mosaic aneuploidy. // J. Med. Genet. – 2007. – Vol. 44, № 8. – P. 521–525.

References

1. Vorsanova S.G., Jurov I.Ju., Solov'ev I.V., Jurov Ju.B. Geterohromatinovye rajony hromosom cheloveka: kliniko-biologicheskie aspekty. M.: Medpraktika, 2008, 300 p.
2. Vorsanova S.G., Jurov I.Ju., Kurinnaja O.S. i dr. Gennomnye anomalii u detej s umstvennoj otstalost'ju i autizmom: ispol'zovanie tehnologii sravnitel'noj genomnoj gibrizidizacii na hromosomah in situ (HRCGH) i molekularnogo kariotipirovanija na DNK mikromatricah (array CGH). Zhurnal Nevrologii i Psihiatrii im. S.S. Korsakova. 2013. no. 8, pp. 46–49.
3. Jurov I.Ju., Vorsanova S.G., Jurov Ju.B. Sovremennye dostizhenija v molekularno-citogeneticheskoj diagnostike nasledstvennyh boleznej (lekcija) // Klinicheskaja i Laboratornaja Diagnostika. 2005. no. 11, pp. 21–29.
4. Edlmann L, Hirschhorn K. Ann. N. Y. Acad. Sci, 2009, Vol. 1151. pp. 157–166.
5. Iourov IY, Yurov YB, Vorsanova SG. Med. Hypotheses. 2008, Vol. 70(no. 2), pp. 456.
6. Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Kurinnaia O.S. et al. Mol. Cytogenet.2012, Vol. 5, pp. 46.
7. Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Voinova V.Y., Mol. Cytogenet. 2013, Vol. 6, pp. 53.
8. Park S.J., Jung E.H., Ryu R.S. et al. Mol. Cytogenet. 2013, Vol. 6, pp. 21.
9. Slavotinek AM. Hum Genet. 2008, Vol. 124(no. 1), pp. 1–17.
10. Spreiz A., Haberlandt E., Baumann M. et al. Clin. Genet. 2014, Vol.86(no. 4), pp. 361–366.
11. Vorsanova SG, Iourov IY, Beresheva AK, et al. Tsitol Genet. 2005. Vol.39(no. 6). pp. 30–36.
12. Vorsanova S.G., Yurov I.Y., Demidova I.A. et al. Neurosci. Behav. Physiol.2007, Vol. 37, no. 6, pp. 553–558.
13. Vorsanova S.G., Yurov Y.B., Soloviev I.V., Iourov I.Y. Curr. Genomics. 2010, Vol.11,no. 6, pp. 440–446.
14. Xu F., Li L., Schulz V.P., et al. Mol. Cytogenet. 2014, Vol.7, pp. 4.
15. Yurov Y.B., Vorsanova S.G., Iourov I.Y. et al. J. Med. Genet. 2007, Vol.44, no. 8, pp. 521–525.

Работа поступила в редакцию 28.11.2014.