

УДК 612.6.05

Л.В. Тавокіна¹, А.О. Бровко¹, О.В. Баронова¹,
О.П. Москаленко¹, Н.Г. Горovenko²

ЦИТОГЕНЕТИЧНА ДІАГНОСТИКА ХРОМОСОМНИХ АНОМАЛІЙ ЗА УЧАСТЮ У ХРОМОСОМИ

Проблема: визначення типу аберації хромосоми Y має велике діагностичне та прогностичне значення. Цитогенетична та молекулярно-цитогенетична діагностика аномалій хромосоми Y має ряд особливостей, у порівнянні з діагностикою аутосом. Сучасна цитогенетика дозволяє ефективно ідентифікувати не тільки кількісні аномалії Y-хромосоми, але й різноманітні структурні аберації, зокрема делеції довгого та короткого плеча, кільцеві хромосоми, ізохромосоми та ізодисцентричні хромосоми утворені з короткого або довгого плеча хромосоми Y. Проте різні методи цитогенетичної та молекулярно-цитогенетичної діагностики мають різний ступінь інформативності. Мета роботи полягала в аналізі результатів цитогенетичних та молекулярно-цитогенетичних досліджень пацієнтів, що мають зміни в структурі хромосоми Y, для оцінки ефективності використаних методів. Методи: каріотипування проводилось відповідно до стандартних методик. Були використані методи диференціального забарвлення GTG, CBG, QFQ та NOR-Ag. FISH проводилася відповідно до інструкцій виробника для CEP, LSI та WCP ДНК-проб. Результати: 135 з 3729 пацієнтів були відібрані для подальшої діагностики. 90,3% з них мали варіабельність довжини довгого плеча хромосоми Y. Структурні зміни хромосоми Y були знайдені у 9,7% випадків. Ефективність застосування QFQ методу склала 100%. Делеції хромосоми Y успішно виявлялись за допомогою теломерних ДНК-проб. Ідентифікація маркерних хромосом була успішно проведена шляхом послідовного застосування WCP ДНК-проб, CBG фарбування та CEP ДНК-проб. Структуру маркерних хромосом визначали за допомогою LSI ДНК-проб, та NOR-Ag фарбування. Новизна результатів дослідження: наш досвід показує, що застосування простих цитогенетичних методів може визначити більшу частину змін хромосоми Y, без застосування складних та дорогих методик. Висновки: виважене використання доступних діагностичних методів може пришвидшити та спростити діагностичний процес.

Ключові слова: варіативність хромосом людини

Вступ. Визначення типу аберації хромосоми Y має велике діагностичне та прогностичне значення. Цитогенетична та молекулярно-цитогенетична діагностика аномалій хромосоми Y має ряд особливостей, у порівнянні з діагностикою аутосом. Сучасна цитогенетика дозволяє ефективно ідентифікувати не тільки кількісні аномалії Y-хромосоми, але й різноманітні структурні аберації [1], зокрема делеції довгого та короткого плеча, кільцеві хромосоми [2], ізохромосоми та ізодисцентричні хромосоми утворені з короткого або довгого плеча хромосоми Y [3]. Проте різні методи цитогенетичної та молекулярно-цитогенетичної діагностики мають різний ступінь інформативності.

Мета роботи полягала в аналізі результатів цитогенетичних та молекулярно-цитогенетичних досліджень пацієнтів, що мають зміни в структурі хромосоми Y, для оцінки ефективності використаних методів.

Методика

В період з 2012 р. по 2015 р. загалом було обстежено 3729 чоловіків. Середній вік чоловіків був $36 \pm 7,4$ років. Каріотипування проводилося відповідно до стандартних методик [4]. Для аналізу метафазних пластинок лімфоцитів периферичної крові застосовували методи диференційного забарвлення GTG (G-bands by trypsin using

Giemsa), CBG C-bands by barium hydroxide using Giemsa, QFQ (Q-bands by fluorescence using quinacrine), NOR-Ag (Nucleolar Organizer Region staining by AgNO₃) [5]. Додатково застосовувався метод FISH з використанням прицентромерних (CEP), теломерних (TelYp/TelYq) (фірми Vysis, США) та ДНК-проб до всієї хромосоми (WCP – Whole Chromosome Painting) (фірми CytoCell, UK). Постановка та аналіз результатів FISH здійснювалися відповідно до інструкцій виробника. Для аналізу каріотипів та створення ілюстрацій використовували комп'ютерну програму CytoVision (США). Каріотипи записувалися відповідно до вимог міжнародної системи класифікації хромосом людини ISCN 2013 (International System for Human Cytogenetic Nomenclature)[6].

Результати та обговорення

В ході цитогенетичної аналізу методом GTG було одержано 3594 (96,4%) записів каріотипів, які дозволили зробити остаточне висновок про хромосомний набір пацієнта та не потребували подальшої діагностики. Але 135 (3,6%) каріотипів, де зміни торкалися хромосоми Y, вимагали додаткових діагностичних кроків. Варіабельність розміру гетерохроматину довгого плеча хромосоми Y була виявлена у 122 випадках (90,3%). Структурні зміни хромосоми Y були виявлені у 13 випадках (9,7%) та були представлені інверсіями, делеціями, дериватними та маркерними хромосомами, які потребували подальшого уточнення. Застосування методу QFQ дозволило ідентифікувати 71 випадок (59,4%) збільшення та 51 випадок (40,6%) зменшення гетерохроматину довгого плеча хромосоми Y. Ефективність застосування QFQ методу склала 100%. А для підтвердження або виключення інверсій та делецій хромосоми Y використовувались 2 види теломерних ДНК-проб - до коротких і довгих плечей хромосоми Y (TelYp та TelYq). Присутність теломерних ділянок на короткому та довгому плечах аберантної хромосоми Y вказувала на інверсію в межах даної хромосоми. Навпаки, відсутність локусу Ypter або Yqter вказувала на термінальну делецію відповідного плеча. Визначення хромосоми Y як дериватної здійснювалося за допомогою центромерних ДНК-проб до хромосоми Y.

Ідентифікація маркерних хромосом потребувала послідовного застосування FISH із WCP ДНК-пробами, CBG забарвлення, FISH із центромерними і теломерними ДНК-пробами та NOR-Ag методу диференційного забарвлення. Походження маркерної хромосоми визначали за допомогою WCP ДНК-проб. Після встановлення номеру хромосоми, з якої утворилася маркерна хромосома, проводили CBG фарбування, а для виявлення центомери - FISH із центромерними ДНК-пробами до відповідної хромосоми. У разі присутності двох центромер визначали їх стан - активна/неактивна. Так у 3-х випадках з маркерними хромосомами була виявлена одна центромера, а в одному випадку методом FISH маркерна хромосома була ідентифікована як псевдоізодидцентрична [7]. Псевдоізодидцентрична хромосома, як правило, у своєму складі містить дві центромери, одна з яких є неактивною [Рис.1]. NOR-Ag фарбування використовували для виявлення супутників у складі маркерної хромосоми.

Алгоритм ідентифікації хромосомних аберацій за участю хромосоми Y представлений на рис. 2.

Цитогенетична діагностика хромосомних аберацій за участю хромосоми Y має ряд особливостей та передбачає обов'язкове застосування від 2-х до 4-х методів диференційного забарвлення [8]. Наші дослідження продемонстрували, що зміни хромосоми Y мали місце у 3,6% від усіх обстежених чоловіків. Подальша ідентифікація поліморфних варіантів норми (90,3%) потребує застосування методу QFQ, надійно виявляє поліморфізм довжини гетерохроматину довгого плеча хромосоми Y [9], і на

ранньому етапі діагностики дозволяє сформулювати кінцевий цитогенетичний висновок, що і було нами продемонстровано.



Рис.1. а - GTG зображення псевдоізоциентричної хромосоми Y. б - FISH із центромєрними ДНК-пробами до хромосоми Y. в - ідеограма псевдоізоциентричної хромосоми Y.

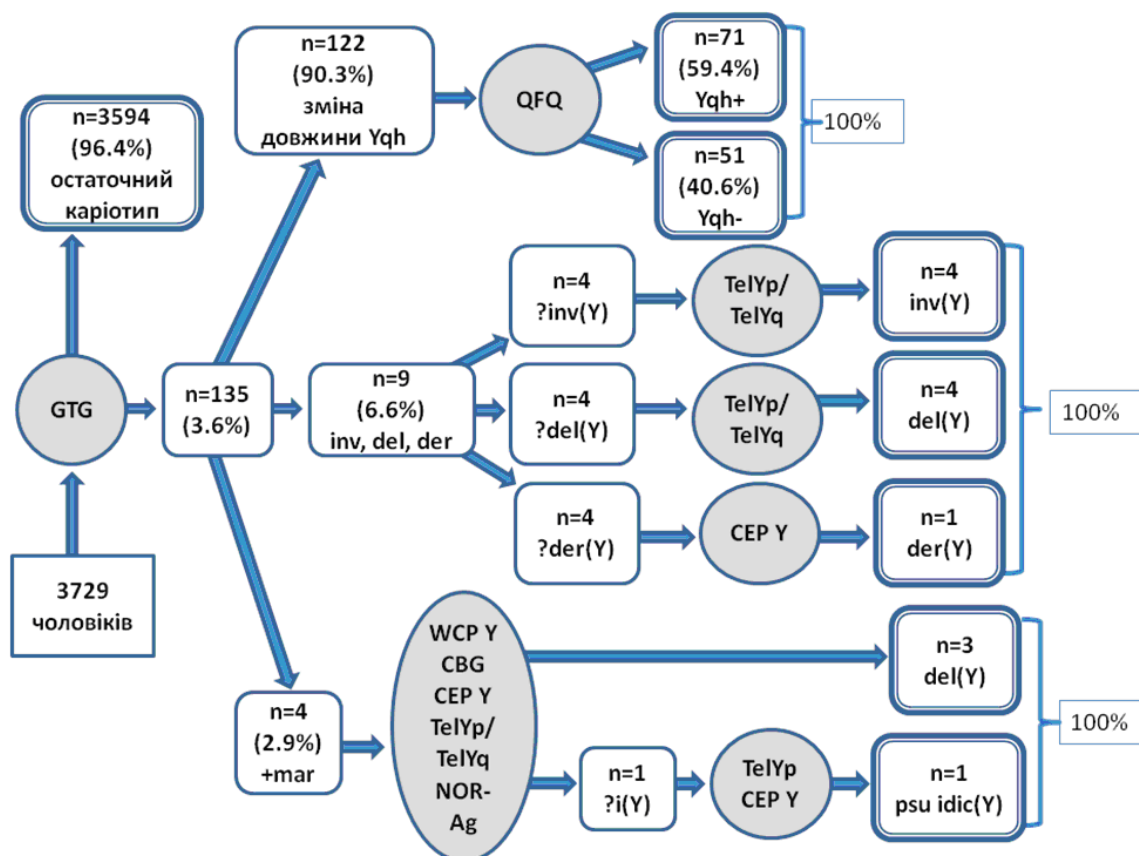


Рис.2. Алгоритм ідентифікації хромосомних аберацій за участю хромосоми Y

- Метод дослідження
- Остаточний каріотип не встановлено
- ▣ Каріотип встановлено остаточно

Методом CBG визначається положення та стан центромєри аберантної хромосоми, що є важливим у формуванні формули каріотипу. За допомогою методу NOR-Ag можна виявити присутність супутників та їх розмір на аберантній хромосомі або виключити їх наявність. Застосування методу NOR-Ag є необхідним у разі отримання суперечливих даних після GTG фарбування, якщо в каріотипі виявлено

екстремально збільшені короткі плечі хромосом групи D та G і є необхідність перевірити присутність або відсутність супутників на цих хромосомах [10]. Дані отримані в ході попередньої цитогенетичної діагностики методами QFQ, CBG та NOR-Ag можуть бути використані під час планування діагностики методом FISH та уточнення каріотипу. Якщо після проведення диференційного фарбування встановлення каріотипу неможливе то для остаточного уточнення складу та структури аберантної хромосоми Y зазвичай використовується панель із центромерних та теломерних ДНК-проб до хромосоми Y та інших залучених у перебудову хромосом [11]. В разі виявлення в каріотипі пацієнта маркерної хромосоми для її ідентифікації та встановлення структури доцільним є додаткове використання WCP ДНК-проб та панель з центромерних та теломерних ДНК-проб до хромосоми Y [12].

Таблиця 1.

Результати каріотипування чоловіків 2012-2015р.р.

Каріотип (остаточний запис каріотипу)	Кількість досліджень (n=3729)
46,XY	3594
46,XYqh+	71
46,XYqh-	51
46,X,inv(Y)(p11.1q11.2)	1
46,X,inv(Y)(p11.2q11.23)	1
46,X,inv(Y)(p11q11)	2
mos46,X,+mar.ish del(Y)(DYZ3+)/45,X	1
46,X,+mar.ish del(Y)	1
46,X,?der(Y),der(21;21)(q10;q10),+21.ish	1
46,X,del(Y),der(21;21)(q10;q10),+21	1
mos 45,X[14]/46,X,+mar.ish psu idic(Y)(q11.23)[30]	1
46,X,del(Y)(q11.2)	1
46,X,del(Y)(q.11.23)	1
46,X,del(Y)(q?11.2)	2
45,X,der(Y),-15.ish der(Y)t(Y;15)(q12;q15)	1

Висновки

1. Застосування методу GTG дозволяє відокремити 90.3% випадків із поліморфізмом довжини гетерохроматину довгого плеча хромосоми Y від 9,7% - каріотипів із аномалією цієї хромосоми.
2. 100% випадків із поліморфними варіантами можна ідентифікувати за допомогою QFQ без застосування додаткових методів.
3. Для ідентифікації інверсій та делецій хромосоми Y достатньо методу FISH із теломерними ДНК-пробами, а дериватні хромосоми Y визначаються за допомогою центромерних ДНК-проб до хромосоми Y.
4. Маркерні хромосоми, що походять від хромосоми Y, можна ідентифікувати лише методом FISH із ДНК-пробами до всієї хромосоми з подальшим уточненням їх структури за допомогою послідовного застосування CBG забарвлення, методу FISH із центромерними та теломерними ДНК-пробами до хромосоми Y.

5. Застосування запропонованого алгоритму цитогенетичної та молекулярно-цитогенетичної діагностики дозволяє у 100% випадків розмежувати нормальні та патологічні каріотиби зі змінами хромосоми Y.

Література

1. Unique 45,X/46,XY including Y chromosome rearrangements / Rare Chromosome Disorder Support Group [Electronic recourse] - Accessed mode: http://www.rarechromo.org/information/Chromosome_Y/45X%2046XY%20including%20Y%20chromosome%20rearrangements%20FTNW.pdf
2. Angelo V. Molecular and cytogenetic characterization of a structural rearrangement of the Y chromosome in an azoospermic man / V. Bertini, E. Rapalini, F. Baldinotti, D. Di Martino, P. Simi // *Fertility and Sterility*. – 2004. – V. 81. – № 5. – P. 1388-1390
3. Ying Hui Lin. Isochromosome of Yp in a man with Sertoli-cell-only Syndrome / Ying Hui Lin, Louise Chuang, Yung Ming Lin, Ying Hung Lin, Yeng Ni Teng, Pao Lin Kuo // *Fertility and Sterility* – 2005. – V. 83. – №3 – P. 764-766
4. Ворсанова С.Г. Медицинская цитогенетика / С.Г. Ворсанова, Ю.Б. Юров, В.Н. Чернышов // *МедПрактика*. – 2006. – С. 300
5. Кузнецова Т.В. Медицинские лабораторные технологии: справочник. Медицинские лабораторные технологии / Т.В. Кузнецова, Ю.А. Логинова, О.Г. Чиряева, А.А. Пендина, В.С. Баранов // *Интермедика* – 1998. – Т.2. – С.550-571
6. ISCN International System for Human Cytogenetic Nomenclature. – 2013
7. Elisabeth E. Centromere activity in dicentric small supernumerary marker chromosomes / Y.Kinya, B. Ahmed, A.Weise, M. Manvelyan, T. Liehr // *Chromosome Res* – 2010. – V.18 – P. 555-562
8. Wyandt H. E. Human Chromosome Variation: Heteromorphism and polymorphism / V. S. Tonk // *Springer Netherlands* – 2012. – P.7-16
9. Paris Conference Supplement. Standardization in human genetics. Birth defects / The National Foundation, New York – 1975. – V. 11 – №9
10. Howell W.M. Differential staining of the satellite regions of human acrocentric chromosomes / T.E. Denton, J.R. Diamond // *Experientia* – 1975. – V.31 – P. 260-262
11. Davood M. O. Cytogenetic and molecular genetic analysis of dicentric Y chromosome and its relation to male azoospermia / J. H. Karimzad // *Iranian Journal of Reproductive Medicine* – 2008. – V.6 – №2 – P. 57-64
12. Sheth F. Characterization of sSMC by FISH and molecular techniques / A. Joris, E. Ewers, N. Kosyakova, A. Weise // *European Journal of Medical Genetics* – 2011. – V.54 – №3 – P. 247

References

1. Unique 45,X/46,XY including Y chromosome rearrangements / Rare Chromosome Disorder Support Group [Electronic recourse] - Accessed mode: http://www.rarechromo.org/information/Chromosome_Y/45X%2046XY%20including%20Y%20chromosome%20rearrangements%20FTNW.pdf
2. Angelo V. Molecular and cytogenetic characterization of a structural rearrangement of the Y chromosome in an azoospermic man / V. Bertini, E. Rapalini, F. Baldinotti, D. Di Martino, P. Simi // *Fertility and Sterility*. – 2004. – V. 81. – № 5. – P. 1388-1390
3. Ying Hui Lin. Isochromosome of Yp in a man with Sertoli-cell-only Syndrome / Ying Hui Lin, Louise Chuang, Yung Ming Lin, Ying Hung Lin, Yeng Ni Teng, Pao Lin Kuo // *Fertility and Sterility* – 2005. – V. 83. – №3 – P. 764-766
4. Vorsanova S. Medical cytogenetics / S. Vorsanova, Y. Yurov, V. Chernyshov // *Medpraktika*. - 2006. - P. 300
5. Kuznetsova T. Medical Laboratory Technology: A handbook. Medical laboratory technology / T. Kuznetsov, Y. Loginova, O. Chiryayeva, A. Pendina, V. Baranov // *Intermedika* - 1998 - V.2. - P.550-571
6. ISCN International System for Human Cytogenetic Nomenclature. – 2013
7. Elisabeth E. Centromere activity in dicentric small supernumerary marker chromosomes / Y.Kinya, B. Ahmed, A.Weise, M. Manvelyan, T. Liehr // *Chromosome Res* – 2010. – V.18 – P. 555-562
8. Wyandt H. E. Human Chromosome Variation: Heteromorphism and polymorphism / V. S. Tonk // *Springer Netherlands* – 2012. – P.7-16
9. Paris Conference Supplement. Standardization in human genetics. Birth defects / The National Foundation, New York – 1975. – V. 11 – №9
10. Howell W.M. Differential staining of the satellite regions of human acrocentric chromosomes / T.E. Denton, J.R. Diamond // *Experientia* – 1975. – V.31 – P. 260-262

11. Davood M. O. Cytogenetic and molecular genetic analysis of dicentric Y chromosome and its relation to male azoospermia / J. H. Karimzad // Iranian Journal of Reproductive Medicine – 2008. – V.6 – №2 – P. 57-64
12. Sheth F. Characterization of sSMC by FISH and molecular techniques / A. Joris, E. Ewers, N. Kosyakova, A. Weise // European Journal of Medical Genetics – 2011. – V.54 – №3 – P. 247

Summary. Tavokina L., Brovko A., Baronova O., Moskalenko O., Gorovenko N. Cytogenetic diagnostic of chromosome abnormalities involving Y chromosome.

Introduction: Determination of the Y chromosome aberrations type has a great diagnostic and prognostic meaning. Cytogenetic and molecular cytogenetic diagnostics of Y chromosome abnormalities has several features in contrast to the autosomes. Modern cytogenetics can effectively identify not only quantitative abnormalities of Y chromosome, but also various structural aberrations, including the deletions of both arms, ring chromosomes, isochromosomes and pseudoisochromosomes derived from short or long arm of Y chromosome. However, different methods of cytogenetic and molecular cytogenetic diagnostics have a different informative value.

Purpose : The aim of present study was to analyze the cytogenetic and molecular cytogenetic diagnostics results for patients with changes in Y chromosome structure, and to evaluate and compare the used methods efficiency.

Methods: karyotyping was done according to the standard methods. GTG, CBG, QFQ and NOR-Ag methods of differential staining were used. FISH was performed according to the manufacturer instructions for CEP, LSI and WCP DNA-probes.

Results: 135 of 3729 patients were taken for further diagnosis. 90,3% of them had variation in Yq-arm length. Structural Y chromosome changes were founded in 9.7%. QFQ staining showed 100% efficiency. The deletions in Y chromosome were clearly detected by telomere DNA-probes. Marker chromosome identification was successful by consistent application of WCP probes, CBG banding and CEP probes. The structure of marker chromosome defined using LSI probes and NOR-Ag staining.

Originality: our experience shows that using simple cytogenetic diagnostic tools can define great part of Y chromosome pathology, without baseless application of complex and expensive methods.

Conclusion: Prudent use of the available diagnostic methods can simplify and speed up the diagnostic process.

Key words: Human Chromosome Variation

ТОВ «Ісіда-IVF», молекулярно-цитогенетична лабораторія, м. Київ, Україна¹.
НМАПО імені П.Л. Шупика, кафедра медичної та лабораторної генетики²

Одержано редакцією	01.02.2016
Прийнято до публікації	05.02.2016