

// Evrazijskij soyuz uchenyh. 2016. №30-1. P.84-85. (in Russian)
5. *Chuhareva N.A., Runihina N.K., Esayan R.M., Klimenchenko N.I.* Beremennost' i tri osnovnye problemy sovremennyh zhenshchin: ozhirenie, diabet i arterial'naya gipertenziya (v

pomoshch' praktikuyushchemu vrachu) // Consilium Medicum. 2014. Vol. 16. №6. P.5-8. (in Russian)

6. *Guelinckx I.* Maternal obesity: pregnancy complications, gestational weight gain and nutrition // Obesity Reviews. 2008. Vol. 9. P.140-150.

Информация об авторах:

Тагиева Фахрия Аламдаркызы – доктор философии по медицине, ассистент кафедры акушерства и гинекологии II, Азербайджанского медицинского университета, e-mail: fehriya@yandex.ru; ORCID: 0000-0003-4447-1624; SPIN-код: 9864-7889

Information About the Authors:

Tagiyeva Fakhriya Alamdarqizi – Ph.D. in medicine, assistant at the Department of Obstetrics and Gynecology II, Azerbaijan Medical University, e-mail: fehriya@yandex.ru; ORCID: 0000-0003-4447-1624; SPIN-kod: 9864-7889

*ПОНХООН ХЭРЛЭН, ТОМОРХУУ МОНХТУЯА, ДАШЦЭРЭН ИЧИННОРОВ, ЖАВ САРАНТУЯА – 2019

УДК: 575.1/.2:612.071.1:616.899.65

DOI: 10.34673/ismu.2019.42.74.007

КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СИНДРОМА ДАУНА У ПАЦИЕНТОВ, ЗАРЕГИСТРИРОВАННЫХ В МОНГОЛЬСКОЙ АССОЦИАЦИИ СИНДРОМА ДАУНА

Понхоон Хэрлэн¹, Томорхуу Монхтуяа², Дашицэрэн Ичинноров³, Жав Сарантуяа¹

¹Монгольский национальный университет медицинских наук, Улан-Батор, Монголия;

²Институт биомедицины, Улан-Батор, Монголия; ³Больница Медипас, Эрдэнэт, Монголия)

Резюме.

Цель работы: провести цитогенетическое исследование методами кариотипирования, MLPA, FISH, изучить связь полиморфизмов гена *GATA1* у больных с синдромом Дауна в Монголии.

Методы. В работе представлена диагностика синдрома Дауна методами кариотипирования, MLPA, FISH, оценка риска развития осложнений у детей с синдромом Дауна на основании определения мутации гена *GATA1*. Исследование основано на анализе данных 70 больных с синдромом Дауна. Для определения цитогенетической формы были использованы метод MLPA, FISH и кариотипирования в культуре клеток крови. Для определения мутации гена *GATA1* использовали метод секвенирования нуклеотидов.

Результаты. Методом кариотипирования была определена простая трисомия по 21 хромосоме у 100%. Количество 21q22.13, 21q21.1, 21q21.1, 21q11.2, 21q22.11, 21q21.3, 21q22.3 участков 21 хромосомы оказалось в 0,6-1,6 раза больше, чем у здоровых. Исследование культур лейкоцитов периферической крови выявило в 29 случаях простую трисомию по 21 хромосоме (97%) и в 1 случае (3%) – мозаицизм. Результаты исследований полиморфизма гена *GATA1* у детей с синдромом Дауна выявило мутацию гена *GATA1* у одного пробанда, полиморфизм гена *GATA1* у 3 пробандов.

Заключение. Современный метод исследования FISH имеет большое значение в пренатальной диагностике хромосомных болезней, профилактике врождённых пороков развития, в повышении эффективности генетических консультаций. В подавляющем большинстве случаев выявляется простая трисомия. Полиморфизм гена *GATA1* выявлен у 4 людей.

Ключевые слова: синдром Дауна; *GATA1*; полиморфизм генов; кариотип; MLPA; FISH.

CLINICAL AND GENETIC ANALYSIS OF THE DAWN SYNDROME REGISTERED IN MONGOLIAN ASSOCIATION OF DAWN SYNDROME

P. Kherlen¹, T. Munkhtuya², D. Ichinnorov³, J. Sarantuya²

¹Mongolian National Health Sciences University, Ulaanbaatar, Mongolian;

²School of Pharmacy and Biomedicine, Ulaanbaatar, Mongolian; ³Medipas Hospital, Erdenet, Mongolian)

Summary.

Aim: to conduct a cytogenetic study using cryotyping, MLPA, FISH, to study the relationship of polymorphisms of the *GATA1* gene in patients with Down syndrome in Mongolia.

Methods. We estimated the diagnosis of Down syndrome with karyotyping, and the MLPA, FISH methods, finding mutations of the *GATA1* gene. The study is based on an analysis of 70 patients with Down syndrome. In determination of cytogenetic form were used methods of MLPA, FISH and karyotyping in the culture of blood cells. The method of nucleotide sequencing was used to determine the mutation of the *GATA1* gene.

Result. By the method of karyotyping, a simple trisomy was determined for 21 chromosomes in 100%. The number 21q22.13, 21q21.1, 21q21.1, 21q11.2, 21q22.11, 21q21.3, 21q22.3 of the sites of 21 chromosomes was 0,6-1,6 times more than in healthy chromosomes. The study of peripheral blood leukocyte cultures revealed simple trisomy of 21 chromosomes in 29 cases (97%), and mosaicism in 1 case (3%). The results of studies of the polymorphism of the *GATA1* gene in children with Down syndrome revealed a mutation of the *GATA1* gene in one proband, polymorphism of the *GATA1* u gene in 3 probands.

Conclusion. The modern method of research FISH is of great importance in the prenatal diagnosis of chromosomal diseases, the prevention of congenital malformations, in increasing the effectiveness of genetic counseling. In most cases, simple trisomy is detected. Polymorphism of the *GATA1* gene was detected in 4 people.

Key words: Dawn syndrome; *GATA1*; gene polymorphism; karyotype; MLPA; FISH.

Синдром Дауна является самой распространённой анеуплоидийной аномалией. Синдромом Дауна болеет 1 из 1000 живорождённых младенцев. В 94% случаев бо-

лезнь возникает вследствие утроения 21-й хромосомы (трисомия 21), в 4-5% – робертсоновской транслокации, а в 2-3% – мозаицизма [1].

Таблица 1

Порядок праймера, использованного для амплификации гена *GATA1*

| Экзон | Длина (пн) | Прямой праймер (5' to 3') | Обратный праймер (5' to 3') |
|-------|------------|---------------------------|-----------------------------|
| 1 | 397 | CAGGGAGGGTGAAGAGG | GTGGGTTGGAGGAGCTGTAA |
| 2 | 454 | AAGGAGGAAGAGGAGCAGGT | AGTGGTCGGCACATCCAT |
| 3 | 687 | TGTTCTGGTAGCCTGTGGAA | CATGAGAACAGCGTTCCTATATAATG |
| 4 | 382 | CAAGCTTCGTGGAACCTCC | GAGGTAGAACAGGAACAGAGTGG |
| 5 | 355 | CAGAATCCTCAGGCATCAC | GAGGTAGAACAGGAACAGAGTGG |
| 6 | 779 | CAGCTCCTATCAGCCTTGGAA | TGTCATCAGAGGCCACAGG |

После рождения ребёнка с синдромом Дауна можно сразу диагностировать болезнь при наличии 4-5 признаков из следующих симптомов: плоское широкое лицо, рефлекс Мора, гипотония, гиперподвижность (гипермобильность) суставов, кожная складка на шее, эпикантус (кожная складка, прикрывающая медиальный угол глазной щели), деформация ушных раковин, укорочение конечностей, клинодактилия 5-го пальца (искривлённая форма мизинца), одна поперечная ладонная складка (вместо двух). Хотя синдром Дауна можно диагностировать на основании клинических симптомов необходимо провести цитогенетическое исследование для подтверждения диагноза и определения формы болезни для оценки риска повторного рождения ребёнка с данной патологией, генетической консультации для планирования семьи.

Гематологические злокачественные опухоли встречаются в 500 раз чаще у детей с синдромом Дауна по сравнению со здоровыми детьми. Развитие гематологических злокачественных опухолей в ранние сроки болезни Дауна, т.е. в детстве, и деменции в пожилом возрасте различны в каждом индивидуальном случае в зависимости от количественного показателя генов *GATA1* и *APOE* [2,3,4,5].

Определение данных генетических нарушений даёт возможность заранее прогнозировать клиническое течение патологии у детей с синдромом Дауна [6-12].

Метод MLPA (мультиплексная амплификация лигированных зондов) даёт возможность одновременно определить аномалии 21,13,18, X, Y хромосом и является современным высокочувствительным экспресс-методом.

FISH – это анализ, выявляющий структурные перестройки и мозаицизм хромосом с использованием флюоресцирующего вещества является самым современным молекулярно-цитогенетическим методом. Он имеет большое значение в диагностике хромосомных нарушений у эмбрионов.

Цель исследования: провести цитогенетическое исследование методами кариотипирования, MLPA, FISH, изучить связь полиморфизмов гена *GATA1*.

Материалы и методы

Исследование основано на анализе данных 70 больных с синдромом Дауна, зарегистрированных в Ассоциации Даун синдрома Монголии, родители или иные законные представители которых дали добровольное и информированное согласие на участие в протоколе исследования. Исследование носило наблюдательный характер и включало лишь изучение показателей, используемых в рутинной клинической практике. Нарушений требований биомедицинской этики, предусмотренных международными правовыми актами, не допускалось.

Для определения цитогенетической формы были использованы метод MLPA (выделение ДНК из замороженной крови, денатурация ДНК, гибридизация, сшивание, амплификация), метод FISH (по протоколу с использованием Aneu Vysion Multicolor DNA Probe Kit-05)38) и метод кариотипирования в культуре клеток крови. Для определения мутации гена *GATA1* использовали метод секвенирования нуклеотидов (табл. 1).

Полученные данные представлялись в виде абсолютных и относительных величин. Статистическая обработка полученных результатов выполнялась с использованием z-критерия и критерия χ^2 . Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Изучение полиморфизма гена *GATA1* и выявление риска развития гематологических злокачественных опухолей

Количество 21q22.13, 21q21.1, 21q21.1, 21q11.2, 21q22.11, 21q21.3, 21q22.3 участков 21 хромосомы методом MLPA оказалось в 0,6-1,6 раза больше чем у здоровых (табл. 2). Трисомию 21 хромосомы детей с синдромом Дауна определили методом MLPA.

Таблица 2

Результаты исследований проб в группе больных с синдромом Дауна и в контрольной группе методом MLPA

| Хромосомы | Расположение участков хромосом | Больные с синдромом Дауна | Контрольная группа |
|-----------|--------------------------------|---------------------------|--------------------|
| 21 | 21q22.13 | 51872 | 39706 |
| 18 | 18q21.2 | 31566 | 35923 |
| 13 | 13q32.1 | 34576 | 32041 |
| X | Xq12 | 19487 | 22630 |
| Y | Yp11.31 | 30546 | 23504 |
| 21 | 21q21.1 | 42347 | 26736 |
| 18 | 18q21.32 | 24369 | 28415 |
| 13 | 13q13.3 | 19421 | 20766 |
| X | Xq23 | 17330 | 20967 |
| Y | Yp11.31 | 10595 | 22179 |
| 21 | 21q21.1 | 21219 | 24951 |
| 18 | 18q11.2 | 29455 | 26116 |
| 13 | 13q14.2 | 7010 | 24275 |
| X | Xp21.3 | 166 | 22919 |
| Y | Yq11.221 | 21219 | 17345 |
| 21 | 21q11.2 | 19871 | 29765 |
| 18 | 18q23 | 8603 | 380 |
| 13 | 13q21.33 | 26235 | 19324 |
| X | Xp11.4 | 13148 | 20107 |
| Y | Yp11.31 | 21168 | 21094 |
| 21 | 21q22.11 | 7930 | 14070 |
| 18 | 18p11.32 | 28990 | 14059 |
| 13 | 13q34 | 20220 | 10755 |
| X | Xq28 | 23193 | 11804 |
| 21 | 21q21.3 | 15166 | 5333 |
| 18 | 18q21.33 | 19390 | 8617 |
| 13 | 13q13.1 | 17416 | 4904 |
| X | Xp22.12 | 9399 | 7732 |
| 21 | 21q22.3 | 6803 | 4174 |
| 18 | 18q11.2 | 167 | 6426 |
| 13 | 13q14.2 | 23679 | 4973 |
| X | Xq26.1 | 3075 | 5422 |

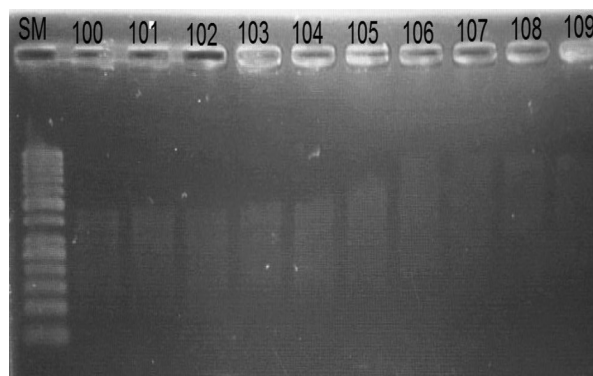
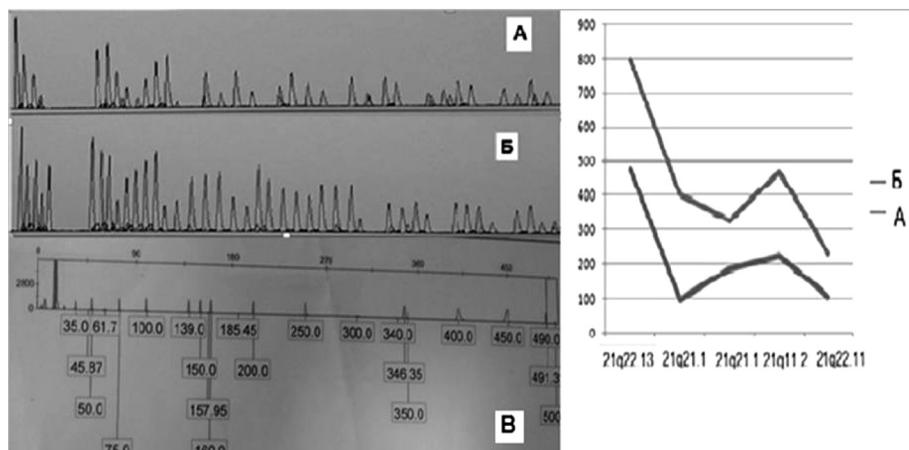


Рис. 1. Разделение 36 частей человеческого генома методом ПЦР.

Выполнена единовременная амплификация 36 частей человеческого генома и определение методом гелевого электрофореза (рис. 1).



Примечания: А – результаты фрагментного анализа проб контрольной группы, Б – результаты фрагментного анализа проб детей с синдромом Дауна, В – величина ROX 500.

Рис. 2. Результаты фрагментного анализа.

Результаты фрагментного анализа детей с синдромом Дауна показано на рис. 2. Из рисунка видно, что плечо 21 хромосомы увеличено в 0,6-1,6 раза.

Методом кариотипирования была определена простая трисомия по 21 хромосоме (рис. 3).

Исследование культур лейкоцитов периферической крови методом флуоресцентной гибридизации (FISH) выявило в 29 (97%) случаях простую трисомию по 21 хромосоме и в 1 (3%) случае – мозаицизм (рис. 4, 5).

Результаты эпидемиологических и цитогенетических исследований, проведённых в Англии, показали, что среди 5737 случаев синдрома Дауна в 95% выявлена простая трисомия, в 4% – Робертсоновская транслокация,

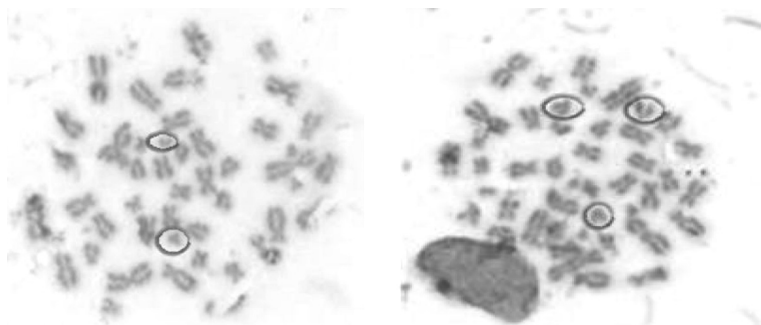


Рис. 3. Результаты анализа кариотипирования.

в 1% – мозаицизм [14]. В Боснии и Герцеговине были обследованы 127 детей, среди которых простая трисомия выявлена в 86,6%, транслокация – в 7,1% и мозаицизм – в 7,3% случаев [15]. Из 248 818 случаев синдрома Дауна в Китае в 95% были выявлено простая трисомия, в 4% – Робертсоновская транслокация, а в 1% – мозаицизм [16].

Результаты исследований полиморфизма гена GATA1 методом секвенирования у детей с синдромом Дауна выявило изменения

гена GATA1(NP_002040.1:p.His71Arg); (NP_002040.1:p.His71Arg) у 11-го пробанда; GATA1(NP_002040.1:p.Tyr69Cys) у 17-го пробанда; (NP_002040.1:p.Lys100Arg) у 19-го пробанда; GATA1(NP_002040.1:p.Tyr69Cys) у 20-го пробанда. Результаты определения этих изменений с использованием 14 software показаны на рис. 6.

Таким образом, современный метод исследования FISH имеет большое значение в пренатальной диагностике хромосомных болезней, профилактике врождённых пороков развития, в повышении эффективности генетических консультаций. В подавляющем большинстве случаев выявляется простая трисомия. Полиморфизм гена GATA1 выявлен у 4 людей.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Прозрачность исследования. Исследование не имело

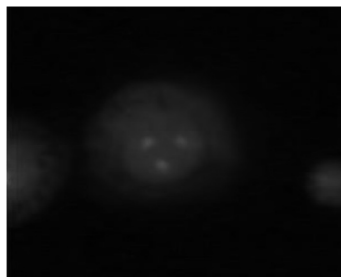


Рис. 4. Простая трисомия по 21 хромосоме.

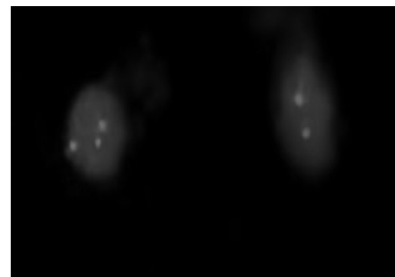


Рис. 5. Мозаицизм 21 хромосомы.

спонсорской поддержки. Исследователи несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать.

Декларация о финансовых и иных взаимодействиях. Все авторы принимали участие в разработке концепции и дизайна исследования и в написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами. Авторы не получали гонорар за исследование.

Материал поступил в редакцию: 26.03.2018 г.

| | | | | | |
|--------------|----------------------|----------------|---------------------------|------------------|------------------|
| SIFT | 0.17 (Tolerable) | Polyphen2_HDIV | 0.871 (Possibly_damaging) | Polyphen2_HVAR | 0.178 (Benign) |
| LRT | 0.901 (Unknown) | MutationTaster | 0.998 (Disease_causing) | MutationAssessor | 1.83 (Low) |
| FATHMM | -5.12 (Damaging) | RadialSVM | 0.729 (Damaging) | LR | 0.901 (Damaging) |
| VEST3 | 0.603 (Damaging) | CADD | 12.77 (Tolerable) | GERP++ | 3.3 (Conserved) |
| phyloP100way | 4.784 (Nonconserved) | SiPhy_29way | 7.813 (Nonconserved) | | |

Рис. 6. Патологические влияния полиморфизма NP_002040.1:p.His71Arg гена GATA 1.

ЛИТЕРАТУРА-REFERENCE

1. Nussbaum R.L., McInnes R.R., Willard H.F., Hamosh A. Thompson & Thompson Genetics in Medicine. Seventh edition. Philadelphia, W.B. Saunders, 2007.

2. Dierssen M., Ortiz-Abalia J., Arqué G., et al. Pitfalls and hopes in Down syndrome therapeutic approaches: in the search for evidence-based treatments // Behav Genet. 2006. Vol. 36. №3.

P.454-468.

3. *Devenny D.A., Wegiel J., Schupf N., et al.* Dementia of the Alzheimer's type and accelerated aging in Down syndrome // *Sci Aging Knowledge Environ.* 2005. Vol. 2005 (14). dn1.
4. *Zana M., Janka Z., Kálmán J.* Oxidative stress: A bridge between Down's syndrome and Alzheimer's disease // *Neurobiol Aging.* 2007. Vol. 28. №5. P.648-676.
5. *Mao R., Zielke C.L., Zielke H.R., Pevsner J.* Global up-regulation of chromosome 21 gene expression in the developing Down syndrome brain // *Genomics.* 2003. Vol. 81. №5. P.457-467.
6. *Zhao Q., Lee J.H., Pang D., et al.* Estrogen receptor-Beta variants are associated with increased risk of Alzheimer's disease in women with down syndrome // *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2011. Vol. 32. №4. P.241-249. DOI: 10.1159/000334522.
7. *Chace C., Pang D., Weng C., et al.* Variants in CYP17 and CYP19 cytochrome P450 genes are associated with onset of Alzheimer's disease in women with down syndrome // *J. Alzheimers Dis.* 2012. Vol. 28. №3. P.601-612. DOI: 10.3233/JAD-2011-110860.
8. *Chitty L.S., Kistler J., Akolekar R., et al.* Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA): a reliable alternative for fetal chromosome analysis? // *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 2012. Vol. 25. P.1383-1386. DOI: 10.3109/14767058.2011.636093.
9. *Gerdes T., Kirchhoff M., Lind A.M., et al.* Computer-assisted prenatal aneuploidy screening for chromosome 13,18,21,X and Y based on multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) // *Eur J Hum Genet.* 2005. Vol. 13. P.171-175.
10. *Chan K.G., Abdullah K.L., Ling H.K.* Quality of life among Malaysian mothers with a child with Down syndrome // *International Journal of Nursing Practice.* 2013. Vol. 19. P.381-389. DOI: 10.1111/ijn.12083.
11. *Oliveira E.F., Limongi S.C.* Quality of life of parents/caregivers of children and adolescents with Down Syndrome // *Journal Soc. Bras. Fonoaudiol.* 2011. Vol. 23. №4. P.321-327.
12. *Wayne D.O., Krishnagiri S.* Parent's leisure: the impact of raising a child with Down syndrome // *Occup Ther Int.* 2005. Vol. 12. №3. P.180-194.
13. *Ricci L.A., Hodapp R.M.* Fathers of children with Down's syndrome versus other types of intellectual disability: perceptions, stress and involvement // *J Intellect Disabil Res.* 2003. Vol. 47. Pt 4-5. P.273-284.
14. *Mutton D., Alberman E., Hook E.B.* Cytogenetic and epidemiological findings in Down syndrome, England and Wales 1989 to 1993. National Down Syndrome Cytogenetic Register and the Association of Clinical Cytogeneticists // *Journal of Medical Genetics.* 1996. Vol. 33. P.387-394. DOI:10.1136/jmg.33.5.387
15. *Sotonica M., Mackic-Djurovic M., Hasic S., et al.* Association of Parental Age and the Type of Down Syndrome on the Territory of Bosnia and Herzegovina // *Med Arch.* 2016. Vol. 70. №2. P.88-91. DOI: 10.5455/medarh.2016.70.88-91.
16. *Weiwei Zhao, Fan Chen, Menghua Wu, et al.* Postnatal Identification of Trisomy 21: An Overview of 7,133 Postnatal Trisomy 21 Cases Identified in a Diagnostic Reference Laboratory in China // *PLoS One.* 2015. Vol. 10. №7. P.e0133151. DOI: 10.1371/journal.pone.0133151
17. *Oshepkova O., Seminskii I.* The modern aspects of genetic consultation // *Sibirskij Medicinskij Zhurnal.* 2009. Vol. 89. №4. P.5-9. (in Russian)

Информация об авторах:

Понхоон Хэрлэн – преподаватель, адрес: Монгольский Национальный Университет Медицинских Наук (МНУМН), г. Улан-Батор, ул. Зориг-3, Кафедра педиатрии, тел: +976-99096860, e-mail: kherlen@mnums.edu.mn; Томорхуу Монхтуяа – преподаватель, кандидат медицинских наук, адрес: МНУМН, г. Улан-Батор, ул. Зориг-3, Кафедра молекулярной биологии и генетики, тел: +976-99992450, e-mail: munkhtuya.t@mnums.edu.mn; Дашцэрэн Ичинноров – терапевт, заместитель директора по лечебной части, доцент, кандидат медицинских наук, адрес: Больница Медипас, г.Эрдэнэт, Баян-Ундурсум, Зэст баг, тел: +976-99971561, e-mail: ichinnorov.d@medipas.mn; Жав Сарантуяа – заведующая кафедрой, профессор, кандидат медицинских наук, адрес: МНУМН, г. Улан-Батор, ул. Зориг-3, кафедра молекулярной биологии и генетики, тел: +976-99092771, e-mail: sarantuya.j@mnums.edu.mn

Information About the Authors:

Ponkhooon Kharlan – teacher, address: Mongolian National University of Medical Sciences (MUUMN), Ulan Bator, ul. Zorig-3, Department of Pediatrics, tel: + 976-99096860, e-mail: kherlen@mnums.edu.mn; Tumurhuu Munhtuyaa – teacher, candidate of medical sciences, address: MNUMN, Ulan Bator, ul. Zorig-3, Department of Molecular Biology and Genetics, tel: + 976-99992450, e-mail: munkhtuya.t@mnums.edu.mn; Dashtseren Ichinnorov – therapist, deputy director for the medical part, associate professor, candidate of medical sciences, address: Hospital Medipas, Erdenet, Bayan-Undur sum, Zest bug, tel: + 976-99971561, e-mail: ichinnorov.d@medipas.mn; Zhav Sarantuyaa – head of the department, professor, candidate of medical sciences, address: MNUMN, Ulan Bator, ul. Zorig-3, Department of Molecular Biology and Genetics, tel: + 976-99092771, e-mail: sarantuya.j@mnums.edu.mn