

© О. В. Малышева^{1,2},
А. Н. Баранов¹, А. А. Пендина^{1,2},
Е. С. Шабанова¹, В. С. Баранов¹

¹ ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта»
СЗО РАМН, г. Санкт-Петербург;

² Санкт-Петербургское ГКУЗ
«Диагностический центр (медико-
генетический)»

ДИАГНОСТИКА ХРОСОМНЫХ НАРУШЕНИЙ МЕТОДОМ ГИБРИДИЗАЦИИ НА МИКРОМАТРИЦАХ

УДК: 575

■ **Метод сравнительной геномной гибридикации на микроматрицах — современный высокоэффективный подход, позволяющий осуществлять полногеномное сканирование хромосомного дисбаланса. В статье описаны возможности метода и приведены примеры диагностики наследственной патологии с его использованием.**

■ **Ключевые слова:** сравнительная геномная гибридикация; микроцитогенетические синдромы; хромосомные перестройки; множественные врожденные пороки развития.

Введение

Метод сравнительной геномной гибридикации на микроматрицах (array CGH) позволяет с высокой эффективностью выявлять различные виды хромосомного дисбаланса. При этом с одинаковой эффективностью обнаруживаются как численные аномалии кариотипа (исключая полиплоидии) и крупные структурные перестройки хромосом, выявляемые при стандартном кариотипировании, так и микроделеции и микродупликации, затрагивающие лишь отдельные сегменты хромосом [3, 8].

До недавнего времени для диагностики аномалий кариотипа использовались преимущественно кариотипирование и метод флуоресцентной гибридикации *in situ* (FISH). Стандартное кариотипирование с использованием дифференциальной окраски хромосом позволяет идентифицировать многие хромосомные аномалии, но его разрешающая способность недостаточна для того, чтобы идентифицировать перестройки размером менее 4 миллионов п.о. Метод FISH обладает гораздо более высокой чувствительностью, но нацелен на исследование заранее выбранных локусов и не подходит для комплексного сканирования всего генома. Сравнительная геномная гибридикация, называемая иногда «молекулярным кариотипированием», в значительной степени расширила диагностические возможности при проведении медико-генетического консультирования, а также в значительной степени изменила наши представления о генетической природе таких патологий, как задержка психомоторного развития, умственная отсталость, множественные врожденные пороки развития, аутизм [1, 7].

Для проведения сравнительной геномной гибридикации используют микроматрицу, в ячейках которой иммобилизованы ДНК-зонды. Ячейки строго упорядочены, про каждую из них известно, какой именно зонд в ней находится, и какому участку генома он соответствует. В качестве зондов могут выступать клонированные в бактериальных искусственных хромосомах фрагменты ДНК человека (чипы на основе BAC — bacterial artificial chromosome) или синтетические олигонуклеотиды (олигочипы). При постановке эксперимента используют две пробы ДНК — опытная (ДНК пациента) и контрольная (ДНК здорового индивидуума). Опытный и контрольный образцы ДНК метят разными флуоресцентными красителями (например, Cy5 и Cy3 соответственно), затем смешивают и проводят гибридикацию смеси меченых ДНК с зондами на микроматрице. Результаты гибридикации оценивают с помощью сканера, снимающего количественные показатели флуоресценции для каждой ячейки микроматрицы по двум каналам (длина волны

532 и 635 нм). В том случае, если в опытном образце имеется делеция какого-либо фрагмента ДНК, мы будем наблюдать преимущественную флуоресценцию Су5 (сигнал от контрольной ДНК) в соответствующих ячейках. Если, напротив, в тестовом образце имеется дупликация какого-либо участка, в определенных ячейках мы сможем зарегистрировать преимущественно сигнал флуорофора Су3. С помощью программного обеспечения производится математическая обработка полученных данных, по результатам которой может быть построен *виртуальный кариотип* — цифровой аналог реального кариотипа, содержащий информацию о возможных делециях и дупликациях генетического материала. Разрешающая способность молекулярного кариотипирования зависит от типа используемого чипа и может достигать 200 п.о. при использовании олигонуклеотидов высокого разрешения [6, 8].

В данной статье описаны результаты, полученные при использовании ВАС-чипов CytoChip 3.0 и 4.0 и программы OneClickCGH производства компании PerkinElmer.

Применение метода aCGH для диагностики хромосомных аномалий

1. Идентификация маркерной хромосомы и природы добавочного генетического материала, выявляемого при стандартном кариотипировании на какой-либо хромосоме, может быть довольно затруднительной. Стандартным методом уточняющей диагностики в такой ситуации является FISH, но для ее проведения может понадобиться большое число раундов гибридизации или работа с многоцветными цельнохромосомными зондами. Метод сравнительной геномной гибридизации позволяет легко решить эту проблему, при этом могут быть получены дополнительные сведения о характере хромосомной перестройки.

На рисунке 1 приведены результаты анализа методом aCGH у двух пациентов с выявленными ранее аномалиями кариотипа. У пациента К. при кариотипировании был обнаружен добавочный материал неизвестного происхождения на хромосоме 13; сравнительная геномная гибридизация

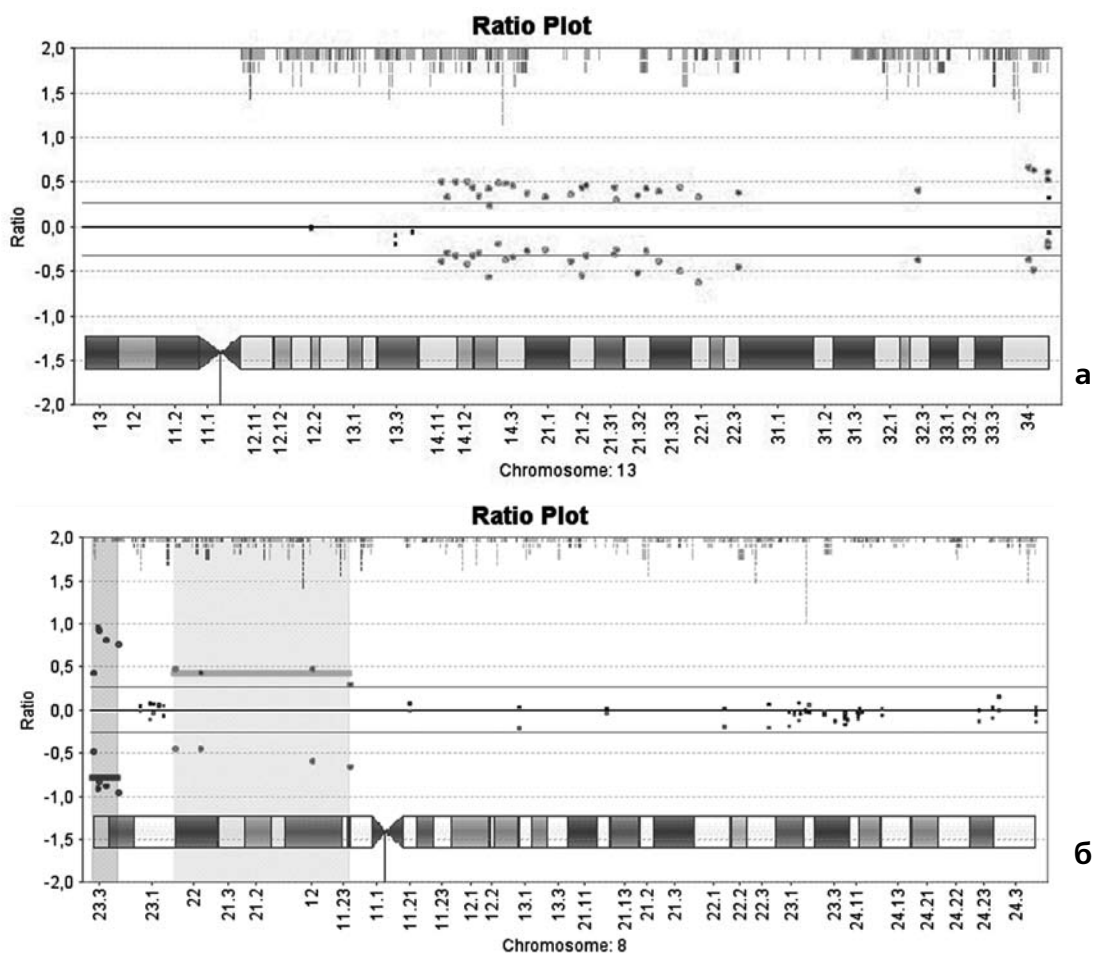


Рис. 1. Результаты aCGH: а) пациент К., дополнительный материал на хромосоме 13. Хромосома 13, чип CytoChip 3.0. Кариотип 46,XY,dup(13)(q14.11-q34); б) пациентка Е., дополнительный материал на хромосоме 8. Хромосома 8, чип CytoChip 3.0; розовым цветом выделена область делеции, зеленым — дупликация. Кариотип 46,XX,del(8)(p23.2p23.3)dup(8)(p11.21p22)

ция позволила идентифицировать присутствие в геноме дополнительной копии участка длинного плеча q14.11-q34 хромосомы 13 (рис. 1а). У пациентки Е. был выявлен дополнительный материал на хромосоме 8. При проведении анализа методом aCGH была выявлена сложная хромосомная перестройка. Установлена крупная интерстициальная дупликация участка короткого плеча p11.23-p24 в сочетании с концевой делецией участка p23.2-23.3 короткого плеча хромосомы 8 (рис. 1б).

2. Уточнение границ хромосомных перестроек, выявленных при стандартном кариотипировании.

На рисунке 2 представлены стандартный и виртуальный кариотипы пациентки М., проходившей обследование по поводу вторичного бесплодия и планирования беременности с применением вспомогательных репродуктивных технологий. При кариотипировании была выявлена делеция

двух сегментов длинного плеча хромосомы X, либо Xq23q24, либо Xq25q26. Сравнительная геномная гибридизация позволила уточнить границы делеции длинного плеча q25q26.3 хромосомы X и правильно подобрать зонды для проведения преимплантационной диагностики методом FISH.

3. Выявление несбалансированных хромосомных перестроек.

Одной из сложнейших проблем при медико-генетическом консультировании является решение вопроса о сбалансированности хромосомных перестроек. В отдельных случаях разрешающая способность стандартного кариотипирования недостаточна для того, чтобы выявить возможный хромосомный дисбаланс. Для решения этой задачи можно использовать диагностику методом FISH, однако в этом случае практически каждый пациент нуждается в индивидуальном подборе нескольких зондов, которые позволяют марки-

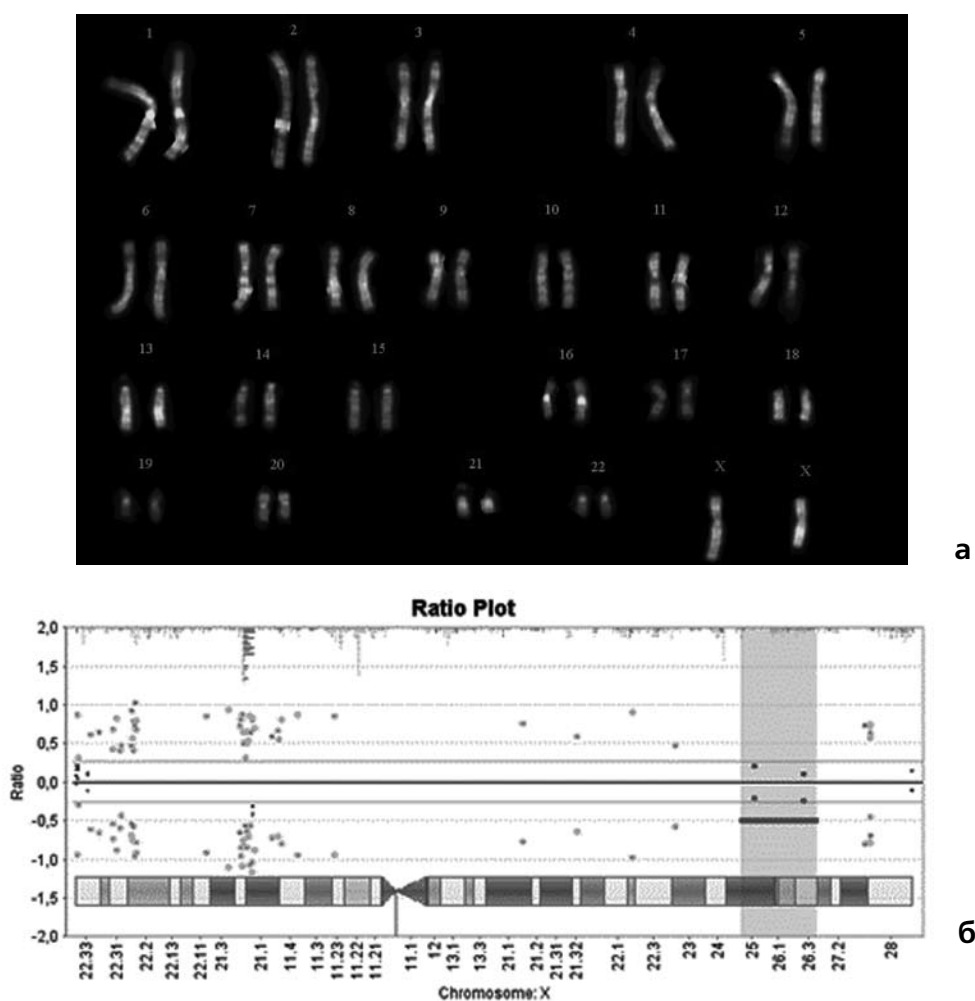
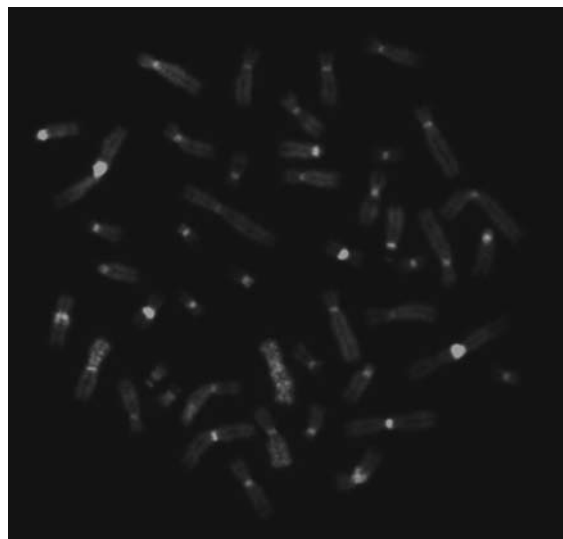
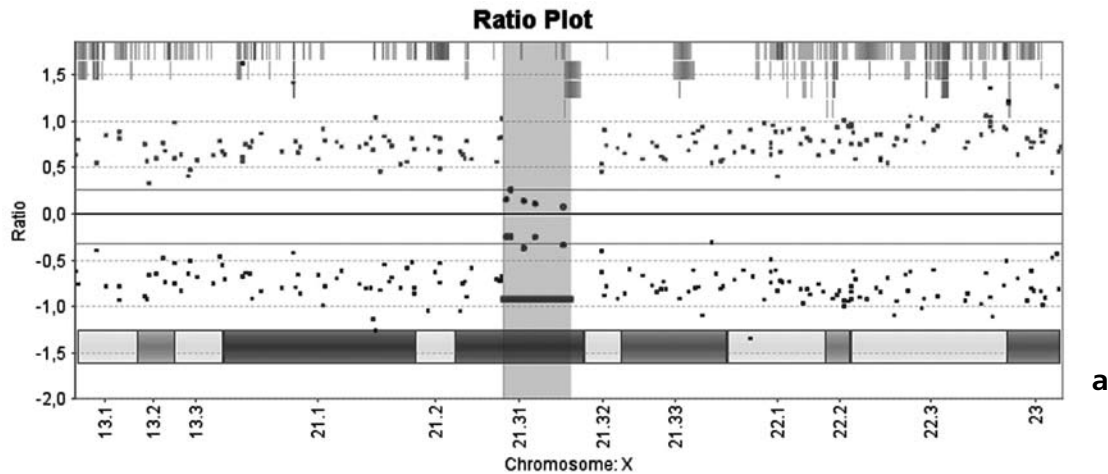


Рис. 2. Результаты кариотипирования и aCGH : а) кариограмма из ФГА-стимулированного лимфоцита пациентки с кариотипом 46,XX, del(X)(q25q26). Стрелкой указана хромосома X с интерстициальной делецией сегмента q25q26 длинного плеча, метафазные хромосомы окрашены с помощью Hexст 33258 с контрастированием актиномицином D; б) результаты aCGH, Чип CitoChip 3.0. Розовым цветом выделена область делеции хромосомы X



б

Рис. 3. а) результаты aCGH, Чип CitoChip 4.0. Розовым цветом выделена область делеции хромосомы X, кариотип пациентки 46,X,t(X;7)(q21;q10)del(X)(q21.31 q21.31); б) результаты флуоресцентной гибридизации in situ с цельнохромосомным зондом к хромосоме X

ровать точки разрыва. Подобная диагностика весьма трудоемка и может не дать необходимой информации. Метод сравнительной геномной гибридизации в этом случае оказывается оптимальным — он позволяет выявить любой существующий хромосомный дисбаланс в пределах разрешающей способности микроматрицы.

Пример такой диагностики приведен на рисунке 3. У пациентки Р. была выявлена неунаследованная транслокация 46,X,t(X;7)(q21;q10), по данным кариотипирования — сбалансированная. Однако у пациентки наблюдались низкий рост, множественные кисты внутренних органов и ряд микроаномалий, что заставляло усомниться в сбалансированности кариотипа. При проведении сравнительной геномной гибридизации была выявлена делеция подсегмента q21.31 хромосомы X размером 3,5 млн п. о. и не было выявлено изменений копийности по-

следовательности хромосомы 7. Таким образом, была установлена частичная моносомия по под-сегменту q21.31 хромосомы X, расположенному в точке разрыва.

4. Микроаномалии хромосом при МВПР и нормальном кариотипе.

Сравнительно недавно была выделена новая группа наследственной патологии — микроцитогенетические синдромы, связанные с небольшими делециями и дупликациями отдельных сегментов хромосом. Во многих случаях их клиническая диагностика не вызывает сомнений, а способом подтверждающей диагностики является FISH. Однако в ряде случаев (например, при ранней диагностике) клиническая картина заболевания может быть не типична, а индивидуальные фенотипические особенности пациента могут затруднять диагностику. Кроме того, к МВПР и врожденной патологии могут приво-

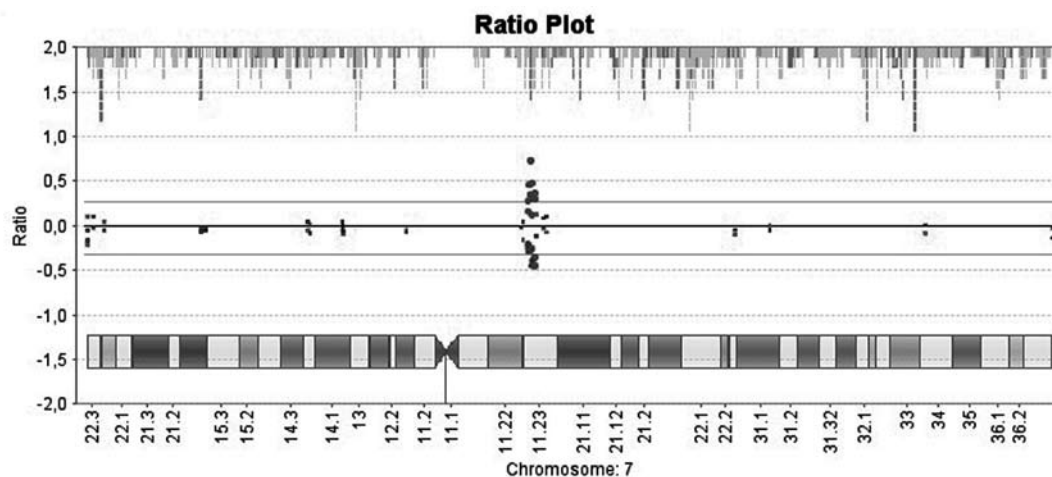


Рис. 4. Результаты aCGH, Чип CitoChip 3.0. Красным цветом выделена область делеции длинного плеча хромосомы 7

дить не только сравнительно распространенные аномалии, но и редкие и уникальные микроперестройки, не идентифицируемые при стандартном кариотипировании.

На рисунке 4 представлены результаты aCGH анализа пациентки К. в возрасте 1 месяца. У девочки отмечалась задержка внутриутробного развития, порок сердца, задержка психомоторного развития, дизморфичный фенотип, что не формировало клиническую картину, специфичную для какого-либо известного наследственного синдрома. При проведении анализа была выявлена делеция сегмента q11.23 хромосомы 7 размером 1,1 млн п. о., что позволило установить диагноз синдрома Вильямса. Дальнейшее наблюдение за пациенткой, действительно, позволило увидеть формирование типичной картины данного микроделеционного синдрома.

Заключение

Метод сравнительной геномной гибридизации на микроматрицах позволяет обнаружить большинство несбалансированных хромосомных аномалий, таких как численные хромосомные аномалии, делеции и дупликации участков хромосом размером от 200 п. н. (при использовании олигонуклеотидных микроматриц) и от 0,5 млн п. н. (при использовании чипов на основе ВАС). Возможно выявление мозаичных анеуплоидий, если доля аномального клона не ниже 10% [2]. При проведении aCGH невозможно установление сбалансированных хромосомных перестроек (инверсий и транслокаций, в т. ч. робертсоновских), полиплоидии, однородительской дисомии (ОРД) и точковых генных мутаций. Применение олигонуклеотидных микроматриц, которые позволяют тестировать SNP и одновременно проводить сравнительную геномную гибридизацию дает возможность рас-

ширять диагностические возможности метода aCGH и выявлять полиплоидию, ОРД и мажорные генные мутации.

В постнатальной диагностике причин МВГР, умственной отсталости, ЗПМР, расстройств аутистического спектра сравнительная геномная гибридизация является наиболее информативным методом, позволяющим выявить причину патологии в 15–20% случаев [1, 3, 4]. Метод aCGH начинает все шире применяться при преимплантационном генетическом скрининге на клетках трофобласта, заметно повышая эффективность ЭКО [5]. Метод aCGH также применяется при проведении пренатальной диагностики, однако его повсеместное внедрение ограничивают трудности интерпретации полученных данных и достаточно высокая стоимость микрочипов.

Применение метода aCGH может быть исключительно полезным при проведении медико-генетического консультирования для уточнения диагноза и выявления причин заболевания. Этот подход имеет намного более высокую разрешающую способность, чем стандартное кариотипирование, и гораздо более универсален, чем диагностика методом FISH. Применение его ограничено высокой стоимостью оборудования и расходных материалов, Однако во многих случаях только aCGH может дать информацию о причинах заболевания и сделать возможной эффективную пренатальную диагностику.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (13–04–01978-а).

ЛИТЕРАТУРА

1. Array CGH as a first line diagnostic test in place of karyotyping for postnatal referrals — results from four years' clinical application for over 8.700 patients / Ahn J. W. [et al.] //Molecular Cytogenetics. — 2013. — Vol. 6, N 1. — P. 16.

2. Comparative genomic hybridization on microarray (a-CGH) in constitutional and acquired mosaicism may detect as low as 8% abnormal cells / Valli R. [et al.] // *Molecular Cytogenetics*. — 2011. — Vol. 4. — P. 4–13.
3. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies / Miller D. T. [et al.] // *Am. J. Hum. Genetics*. — 2010. — Vol. 86, N 5. — P. 749–764.
4. *Edelmann L., Hirschhorn K.* Clinical utility of array CGH for the detection of chromosomal imbalances associated with mental retardation and multiple congenital anomalies // *Annales New York Acad. Sci.* — 2009. — Vol. 1151. — P. 157–166.
5. Genetic analysis of human embryos by metaphase comparative genomic hybridization (mCGH) improves efficiency of IVF by increasing embryo implantation rate and reducing multiple pregnancies and spontaneous miscarriages / Sher G. [et al.] // *Fertil. Steril.* — 2009. — Vol. 92, N 6. — P. 1886–1894.
6. *Keren B., Le Caignec C.* Oligonucleotide microarrays in constitutional genetic diagnosis // *Expert Revue Mol. Diagn.* — 2011 — Vol. 11, N 5. — P. 521–532.
7. Molecular karyotyping by array CGH in a Russian cohort of children with intellectual disability, autism, epilepsy and congenital anomalies / Iourov I. Y. [et al.] // *Molecular Cytogenetics*. — 2012. — Vol. 5, N 1. — P. 46.
8. *Shinawi M., Cheung S. W.* The array CGH and its clinical applications // *Drug Discovery Today*. — 2008. — Vol. 13(17–18). — P. 760–770.

Статья представлена Э. К. Айламазяном,
ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН,
Санкт-Петербург

DIAGNOSTICS OF CHROMOSOMAL ABBERATIONS BY ARRAYCGH

Malysheva O. V., Baranov A. N., Pendina A. A.,
Shabanova E. S, Baranov V. S.

■ **Summary:** aCGH is a modern and highly efficient approach for full-genomic scanning of wide spectrum of chromosomal disbalance. Here, we discuss diagnostic capabilities of aCGH and give examples of diagnostic cases.

■ **Key words:** comparative genomic hybridization; chromosomal aberrations; microdeletion syndrome; multiple congenital anomalies.

■ Адреса авторов для переписки

Мальшиева Ольга Викторовна — к. б. н., врач-лабораторный генетик. Санкт-Петербургское ГКУЗ «Диагностический центр (медико-генетический)». 194944, Россия, Санкт-Петербург, Тобольская ул., д. 5. **E-mail:** omal99@mail.ru.

Malysheva Olga Viktorovna — geneticist, PhD. City Diagnostic center of medical genetics. 194944, St. Petersburg, Tobolskaya St., 5, Russia. **E-mail:** omal99@mail.ru.

Баранов Александр Николаевич — к. б. н., старший научный сотрудник. ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН. 199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3. **E-mail:** alexbar@mail.ru.

Baranov Aleksandr Nikolayevich — senior researcher, PhD. D. O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology, RAMS. 199034, St. Petersburg, Mendeleevskaya Line, 3, Russia. **E-mail:** alexbar@mail.ru.

Пендина Анна Андреевна — к. б. н., врач-лабораторный генетик. Санкт-Петербургское ГКУЗ «Диагностический центр (медико-генетический)». 194944, Россия, Санкт-Петербург, Тобольская ул., д. 5. **E-mail:** pendina@mail.ru.

Pendina Anna Andreyevna — cytogenetics, PhD. City Diagnostic center of medical genetics. 194944, St. Petersburg, Tobolskaya St., 5, Russia. **E-mail:** pendina@mail.ru.

Шабанова Елена Сергеевна — врач-генетик. ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН. 199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3. **E-mail:** le_shaja@mail.ru.

Shabanova Yelena Sergeyevna — regular doctor geneticist. D. O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology, RAMS. 199034, St. Petersburg, Mendeleevskaya Line, 3, Russia. **E-mail:** le_shaja@mail.ru.

Баранов Владислав Сергеевич — д. м. н., з. д. н., профессор, член-корр. РАМН. Заведующий лабораторией пренатальной диагностики наследственных и врожденных заболеваний человека. ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН. 199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3. **E-mail:** baranov@VB2475.spb.edu.

Baranov Vladislav Sergeyevich — PhD, professor. Head of laboratory for Prenatal Diagnosis. D. O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology, RAMS. 199034, St. Petersburg, Mendeleevskaya Line, 3, Russia. **E-mail:** baranov@VB2475.spb.edu.