

© О. В. Малышева<sup>1,2</sup>,  
А. Н. Баранов<sup>1</sup>, А. А. Пендина<sup>1,2</sup>,  
Е. С. Шабанова<sup>1</sup>, В. С. Баранов<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Санкт-Петербургское ГКУЗ  
«Диагностический центр (медико-  
генетический)»

## ДИАГНОСТИКА ХРОМОСОМНЫХ НАРУШЕНИЙ МЕТОДОМ ГИБРИДИЗАЦИИ НА МИКРОМАТРИЦАХ

УДК: 575

■ Метод сравнительной геномной гибридации 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 гибридация; микроцитогенетические синдромы; хромосомные перестройки; множественные врожденные пороки развития.

### Введение

Метод сравнительной геномной гибридации 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 гибридации *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 гибридация, 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 гибридации 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 гибридацию смеси меченых ДНК с зондами на микроматрице. Результаты гибридации 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

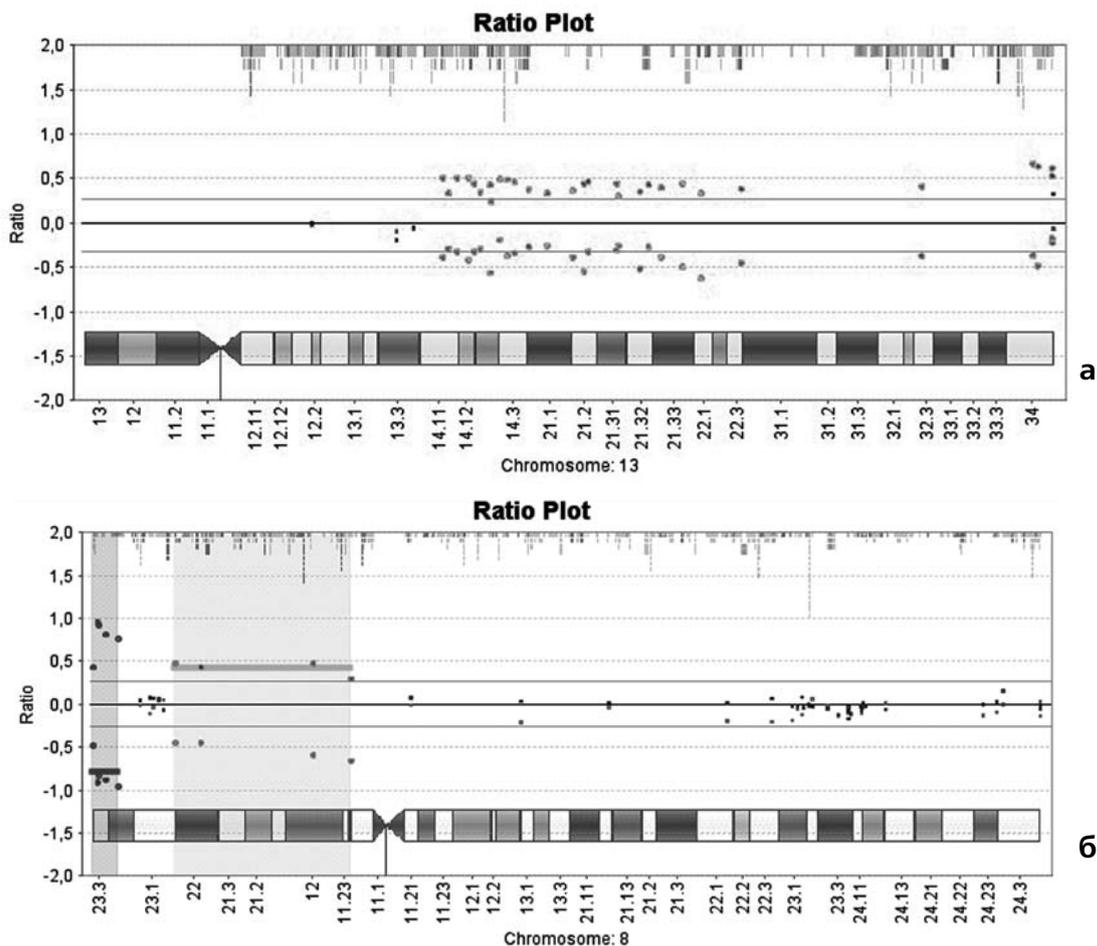


Рис. 1. Результаты aCGH: а) пациент К., дополнительный материал на хромосоме 13. Хромосома 13, чип CytoChip 3.0. Кариотип 46,XY,dup(13)(q14.11-q34); б) пациентка Е., дополнительный материал на хромосоме 8. Хромосома 8, чип CytoChip 3.0; розовым цветом выделена область делеции, зеленым — дупликация. Кариотип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

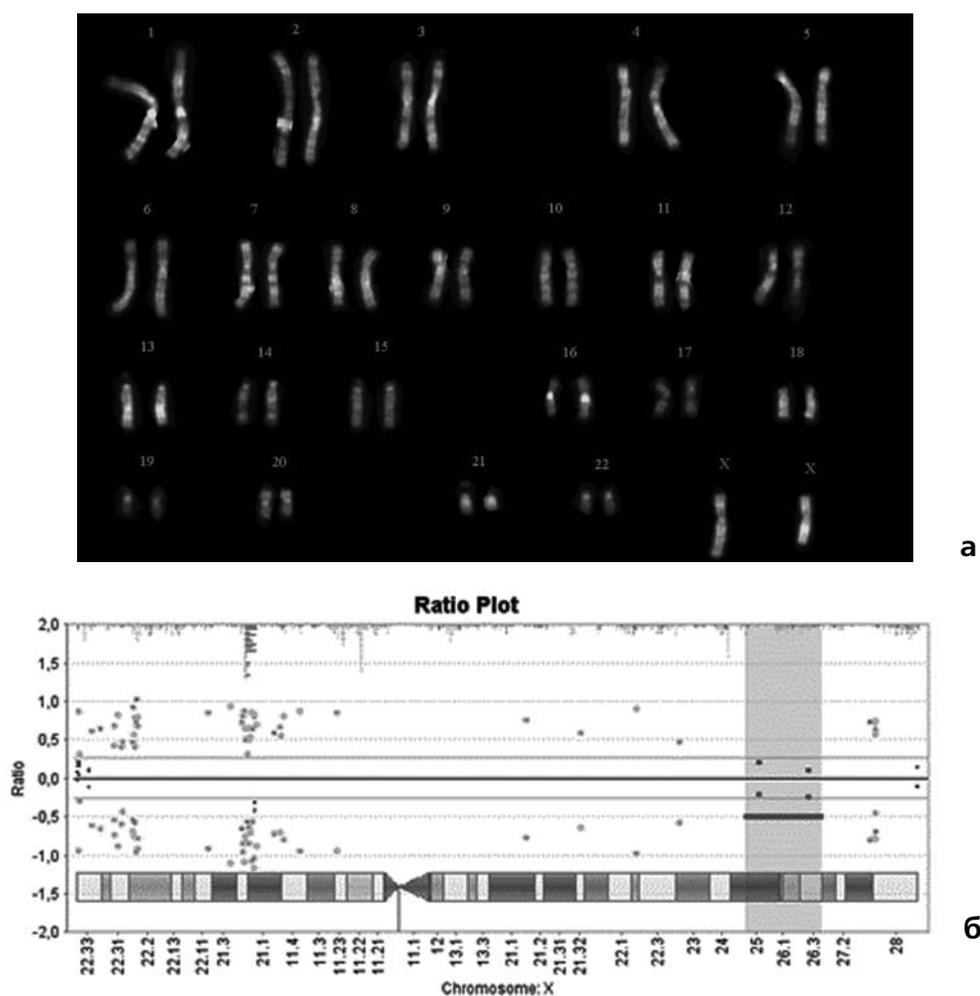
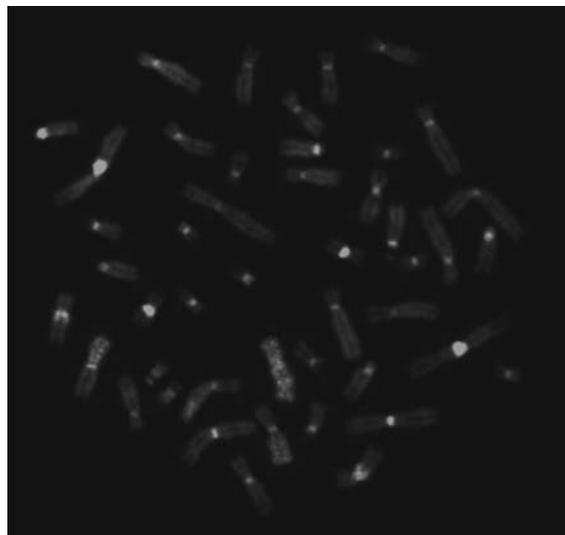
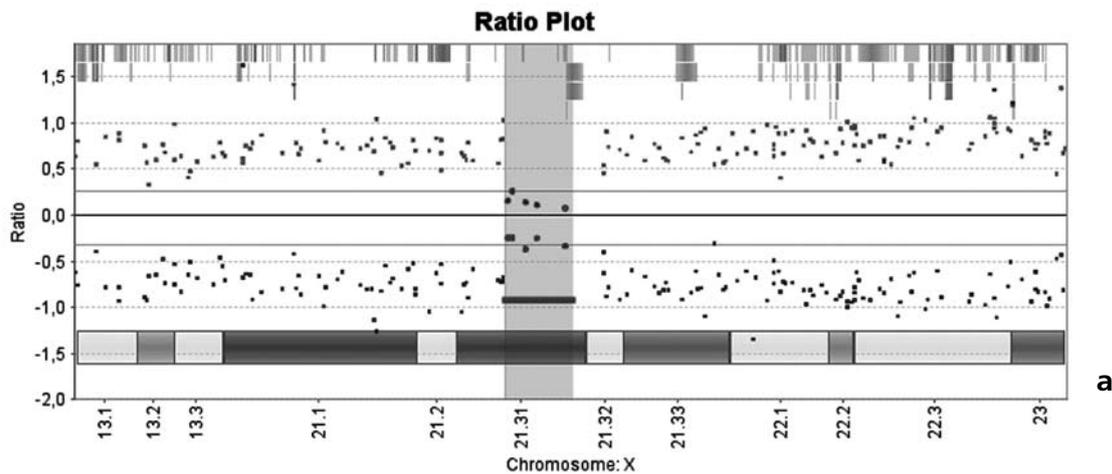


Рис. 2. Результаты кариотипирования и aCGH : а) кариограмма из ФГА-стимулированного лимфоцита пациентки с кариотипом 46,XX, del(X)(q25q26). Стрелкой указана хромосома X с интерстициальной делецией сегмента q25q26 длинного плеча, метафазные хромосомы окрашены с помощью Hexст 33258 с контрастированием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



6

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-

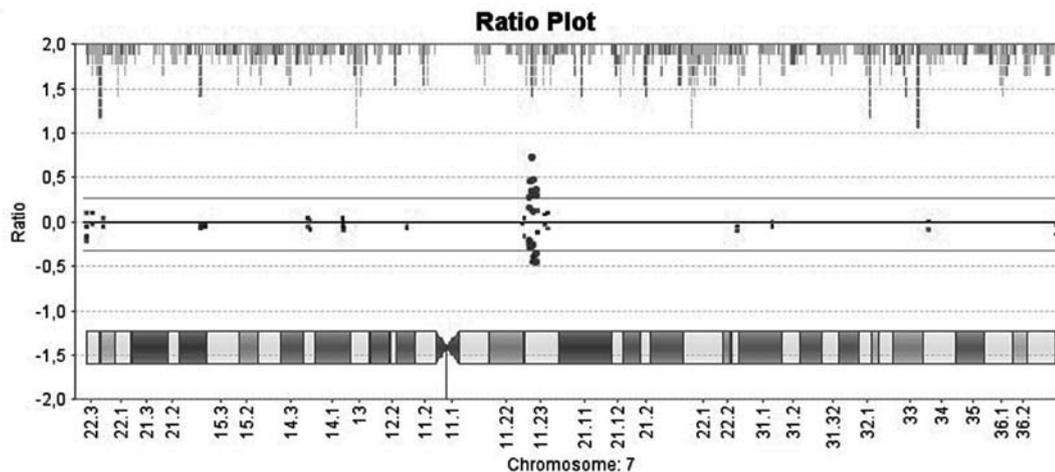


Рис. 4. Результаты aCGN, Чип CitoChip 3.0. Красным цветом выделена область делеции длинного плеча хромосомы 7

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

На рисунке 4 представлены результаты aCGN 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 aCGN 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 aCGN 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 aCGN начинает все шире применяться при преимплантационном генетическом скрининге на клетках трофобласта, заметно повышая эффективность ЭКО [5]. Метод aCGN также применяется при проведении пренатальной диагностики, однако его повсеместное внедрение ограничивают трудности интерпретации полученных данных и достаточно высокая стоимость микрочипов.

Применение метода aCGN 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 aCGN 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](mailto: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](mailto: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](mailto: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](mailto: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](mailto: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](mailto: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](mailto: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](mailto: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](mailto: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](mailto:baranov@VB2475.spb.edu).