

Н.А. Скрябин, А.А. Кашеварова, И.Н. Лебедев

ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ МЕТОДА МАТРИЧНОЙ СРАВНИТЕЛЬНОЙ ГЕНОМНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

УДК 575.224.23:616-079.3

В настоящее время методы классической цитогенетики не могут удовлетворить все возрастающие требования клинической медицины. Развитие флуоресцентных методов исследования (FISH, CGH) сделало возможным выявление многих субмикроскопических хромосомных аномалий. Дальнейшее развитие технологий привело к возникновению нового высокотехнологичного метода – сравнительной геномной гибридизации на микрочипах (array-CGH, a-CGH). Данный метод применяется во многих направлениях клинической генетики, репродуктивной медицины, онкологии. Кроме практического применения, a-CGH используется в фундаментальной медицине, в особенности в изучении причин врожденных пороков развития и недифференцированной умственной отсталости, а также в фундаментальной онкологии.

Ключевые слова: a-CGH, цитогенетическая диагностика, микрочипы.

Currently, the methods of classical cytogenetics cannot meet the increasing demands of clinical medicine. The development of fluorescence in situ hybridization techniques (FISH, CGH) has made possible the identification of submicroscopic chromosome aberrations. Progress of the technology has led to the emergence of new high-tech method – comparative genomic hybridization on microarrays (array-CGH, a-CGH). This method is used in many areas of clinical genetics, reproductive medicine and oncology. Besides practical applications a-CGH is used in fundamental medicine, particularly to study the causes of congenital malformations and undifferentiated intellectual disability, as well as fundamental oncology.

Keywords: a-CGH, cytogenetic diagnostics, microarrays.

Субмикроскопические делеции и дупликации (до 10 Mb) составляют около 15% всех мутаций, обуславливающих наследственную патологию у человека [6]. Одним из наиболее информативных методов исследования для диагностики таких нарушений является сравнительная геномная гибридизация на микрочипах (a-CGH). Разрешающая способность современных микрочипов достигает нескольких десятков kb, при этом сканируется до 1 млн. уникальных локусов генома. Основным преимуществом метода является чрезвычайно высокая разрешающая способность, позволяющая выявлять как субмикроскопические перестройки, так и вариации по числу копий крупных блоков повторов ДНК (Copy Number Variation, CNV). В зависимости от метода определения и используемых микрочипов, CNV составляют до 12% от всего генома человека. Вариации числа повторов могут наследоваться от родителей либо возникать de novo в любом участке генома, их размер может быть сравнительно небольшим – от нескольких сотен тысяч пар оснований. Более 41% CNV перекрываются с известными генами, что указывает на их возможную роль в регуляции экспрессии через эффект дозы или положения [1]. В дальней-

шем анализ геномного состава участков хромосом, затронутых микроструктурными аномалиями или CNV-полиморфизмом, позволит идентифицировать гены, дисбаланс по числу копий которых может приводить к развитию патологии. Заметное в последнее время смещение фокуса в цитогенетических исследованиях от хромосомы к гену, а также ожидаемое внедрение высокопроизводительных технологий полногеномного секвенирования позволяют констатировать появление нового направления в биологии и медицине – цитогеномики [2].

Метод a-CGH основан на принципах стандартной сравнительной геномной гибридизации (c-CGH). Дифференциально меченая контрольная ДНК (обычно меченая красным флюорохромом) и тестируемая ДНК (меченая зеленым) совместно гибридизуются с мелкими фрагментами ДНК человека, нанесенными в определенном порядке на микрочип. Различия между избытком и потерей фрагмента или сбалансированный статус основаны на соотношении флюоресценции зеленого красителя к красному для каждого фрагмента ДНК. Далее с помощью специальных программ обработки изображений все ДНК-сегменты позиционируются на конкретном участке хромосомы, формируя профиль гибридизации – количество ДНК-материала в каждом участке генома.

Микрочипы различаются по своей разрешающей способности. Чипы, использующие крупные сегменты ДНК (100-200 kb), встроенные в искусст-

венные бактериальные хромосомы (BAC – bacterial artificial chromosome), применяются для a-CGH низкого разрешения. В среднем они имеют разрешающую способность 1 Mb (т.е. регистрируют избыток или потерю генетического материала размером 1 Mb, что примерно соответствует 1/10 хромосомного бэнда). Высокоразрешающие микрочипы имеют разрешающую способность в 50-100 kb, в них используют олигонуклеотидные последовательности длиной около 60 нуклеотидов, относительно равномерно покрывающие весь геном. Например, доступные коммерческие микрочипы на 105 000 или 244 000 олигонуклеотидов обеспечивают общее среднее покрытие генома с разрешением примерно 0,02 и 0,01 Mb соответственно, т.е. в 500 и 1000 раз более информативны, чем кариотипирование [3].

Метод a-CGH позволяет в рамках одного анализа выявить все несбалансированные хромосомные перестройки, к которым относятся анеуплоидии, несбалансированные транслокации и микроструктурные аномалии (микроделеции, микродупликации). К ограничениям метода можно отнести неспособность выявлять сбалансированные структурные аномалии (реципрокные транслокации, инверсии и Робертсоновские транслокации). Также остаются не выявленными полиплоидии (три- и тетраплоидии), так как количество ДНК в исследуемом образце выровнено по сравнению с контрольной ДНК по всему геному [8].

Одним из ключевых направлений,

где востребована технология CGH на микрочипах, является репродуктивная медицина. Использование вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) актуально в связи с высокой частотой хромосомных аномалий на ранних этапах эмбрионального развития. Так, у женщин моложе 35 лет при применении ВРТ частота аномальных эмбрионов с хромосомной патологией достигает 60%, а у женщин старше 41 года – 80% [9]. Использование процедуры преимплантационной генетической диагностики (ПГД) позволяет выявлять аномальные эмбрионы, что значительно увеличивает шанс успешной имплантации blastocysts и последующего успешного родоразрешения. В настоящее время в ПГД используются методы FISH и a-CGH. Метод FISH-диагностики позволяет одновременно оценить нарушения только по 5 хромосомам (13, 18, 21, X и Y), анеуплоидия по которым имеет клиническое значение, в то время как использование a-CGH дает возможность полногеномного скрининга как анеуплоидий, так и несбалансированных структурных aberrаций.

Те же преимущества у микрочипов по отношению к FISH-анализу сохраняются и при пренатальной диагностике, где она часто используется по таким показаниям, как наличие у родителей сбалансированной транслокации. Кроме того, a-CGH применяется для выявления причин спонтанных аборт. Так, нами было исследовано 13 спонтанных выкидышей с нормальным кариотипом, установленным с помощью методов классической цитогенетики. В результате данного анализа в каждом случае было выявлено от 3 до 20 CNV, в 4 случаях обнаружены только полиморфизмы, а в 9 – потенциально патогенные CNV.

Микрочиповая технология наиболее распространена в таких направлениях клинической генетики, как диагностика умственной отсталости и пороков развития [4]. Данная тенденция обусловлена тем, что многие недифференцированные формы вышеуказанных патологий возникают вследствие раз-

личных CNV и субмикроскопических хромосомных перестроек. CNV лежат в основе 14–18% случаев умственной отсталости с неясной этиологией [5]. В настоящий момент описано 211 микроделеционных и 79 микродупликационных синдромов с вовлечением 267 геномных локусов [7]. Работы в данном направлении проводились и нашим коллективом. Нами были проанализированы 79 детей с умственной отсталостью и врожденными аномалиями с помощью микрочипов Agilent 44K и 60K. При этом у 35 (44%) пациентов не было выявлено ни одной несбалансированной аномалии. У остальных 44 пациентов были обнаружены различные CNV, которые классифицировали с помощью базы данных DGV (Database of Genomic Variants). У 22 детей наблюдались только полиморфные CNV, а у еще 22 пациентов были выявлены патогенные и потенциально патогенные CNV [4].

Микрочиповые технологии являются неотъемлемой частью современной цитогенетики. Востребованность данного метода обусловлена возможностью одномоментного анализа всего генома с чрезвычайно высокой разрешающей способностью. Учитывая значительные достижения в последнее десятилетие в этой области, а также благодаря постоянно снижающейся стоимости, технология a-CGH в ближайшем будущем может получить широкое применение в практической медицине. Для максимально эффективного внедрения данной технологии в клиническую практику необходимы не только техническое оснащение и квалифицированные кадры, но и максимальная информированность врачей-клиницистов, поскольку основным звеном медицины являются именно они.

Исследования коллектива авторов поддержаны грантом РФФИ № 14-04-32047 мол_а.

Литература

1. Клинико-генетическая характеристика недифференцированной умственной отсталости на основе матричной сравнительной

геномной гибридизации / А.А. Кашеварова, Н.А. Скрябин, А.Д. Черемных [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2013. – Т. 113, № 9. – С. 70-74.

Clinical and genetic analysis of idiopathic intellectual disability based on array comparative genomic hybridization / A.A. Kashevarova N.A., Skryabin, A.D. Cheremnykh [et al.] // Zhurnal neurologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova. – 2013. – Vol. 113(9). – P. 70-74.

2. Матричная сравнительная геномная гибридизация (array-CGH) в диагностике хромосомного дисбаланса и CNV-полиморфизма при анембрионии / И.Н. Лебедев, А.А. Кашеварова, Н.А. Скрябин [и др.] // Журнал акушерства и женских болезней. – 2013. – Т. 62, вып. 2. – С. 117-125.

Array-based comparative genomic hybridization (array-CGH) in analysis of chromosomal aberrations and CNV in blighted ovum pregnancies / I.N. Lebedev, A.A. Kashevarova, N.A. Skryabin [et al.] // Zhurnal akusherstva i zhenskikh boleznej. – 2013. – V. 62(2). – P. 117-125.

3. Молекулярное кариотипирование (aCGH) как современный подход к исследованию причин невынашивания беременности / Т.В. Никитина, А.А. Кашеварова, Н.А. Скрябин [и др.] // Медицинская генетика. – 2013. – Т. 12, № 1. – С. 26-35.

Molecular karyotyping (aCGH) as modern approach for investigations of miscarriage causes / T.V. Nikitina, A.A. Kashevarova, N.A. Skryabin [et al.] // Medicinskaja genetika. – 2013. – V. 12. – № 1. – P. 26-35.

4. Array CGH analysis of a cohort of Russian patients with intellectual disability / A.A. Kashevarova, L.P. Nazarenko, N.A. Skryabin [et al.] // Gene. – 2013. – V. 536(1). – P. 145-150.

5. Genome arrays for the detection of copy number variations in idiopathic mental retardation, idiopathic generalized epilepsy and neuropsychiatric disorders: lessons for diagnostic workflow and research / R. Hochstenbach, J.E. Buizer-Voskamp, J.A.S. Vorstman [et al.] // Cytogenet Genome Res. – 2011. – Vol. 135. – P. 174-202.

6. Identification of disease genes by whole genome CGH arrays / L. Vissers, J.A. Veltman, A.G. Kessel [et al.] // Human Molecular Genetics. – 2005. – Vol. 14. – P. 215-223.

7. Microdeletion and microduplication syndromes / Weise A., Mrasek K., Klein E. [et al.] // J Histochem Cytochem. – 2012. – Vol. 60(5). – P. 346-358.

8. Shaffer L.G. A cytogeneticist's perspective on genomic microarrays / L.G. Shaffer, B.A. Bejjani // Human Reproduction Update. – 2004. – Vol. 10. – No.3. – P. 221-226.

9. Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos / C. Gutierrez-Mateo, P. Colls, J. Sanchez-Garcia [et al.] // Fertil Steril. – 2011. – Vol. 95(3). – P. 953-958.