

<sup>1</sup>Г.С. Святова, <sup>1</sup>Г.М. Березина, <sup>2</sup>Г.К. Мусабалаева, <sup>2</sup>А. Т. Садырбекова

<sup>1</sup>Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии МЗ РК,

<sup>2</sup>Республиканская медико-генетическая консультация

## ПЕРВЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ aCGH ПОЛНОГЕНОМНОГО МЕТОДА СРАВНИТЕЛЬНОЙ ГЕНОМНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ В РЕСПУБЛИКЕ КАЗАХСТАН

*aCGH - это современный и высокоэффективный подход для полногеномного сканирования широкого спектра хромосомных аномалий. При использовании данного метода с высокой эффективностью обнаруживаются как численные аномалии кариотипа и крупные структурные перестройки хромосом, выявляемые при стандартном кариотипировании, так и микроделеции и микродупликации, затрагивающие лишь отдельные сегменты хромосом. В статье будут приведены примеры диагностических случаев.*

**Ключевые слова:** сравнительная геномная гибридизация, микроделеции, множественные пороки развития.

**Введение.** До недавнего времени многие наследственные синдромы с множественными пороками развития и/или умственной отсталостью, дизморфиями а также расстройства аутистического спектра оставались недифференцированными в связи с отсутствием доступной подтверждающей молекулярно-генетической диагностики [1-5]. Основным диагностическим методом в медико-генетическом консультировании являлся цитогенетический анализ кариотипа, который обладает низкой разрешающей способностью и невозможностью диагностировать микроделеционные и микродупликационные синдромы [6-8].

Метод aCGH или молекулярно-генетическое тестирование на микроматрицах позволяет провести исследование всего генома человека. При этом используются более чем 2,6 миллиона маркеров для анализа числа копий генов и примерно 750000 однонуклеотидных snp полиморфизмов. Эта технология обладает большой разрешающей способностью, высотой точностью, чувствительностью и специфичностью. Высокая плотность исследуемых маркеров генома позволяет определить большое количество хромосомных синдромов и несиндромальной патологии, связанной с изменением структуры ДНК.

aCGH метод рекомендован мировым сообществом генетиков как тест первой необходимости в следующих ситуациях [9-11]: врожденные пороки развития, задержка психического развития, аутизм и аутистические расстройства, множественные врожденные пороки развития, эпилепсия и судорожный синдром, подозрение на микроделеционные синдромы, детекция однородительских дисомий и потери гетерозиготности на участках хромосом, при подозрении или наличии в семье наследственных заболеваний (например, нейромышечных заболеваний).

В пренатальной диагностике хромосомный микроматричный анализ используется для уточнения диагноза при наличии ультразвуковых маркеров у плода во время беременности; в преимплантационной диагностике (ЭКО); для выяснения причин потери беременности (диагностика абортного материала) и случаях мертворождения; при синдроме «внезапной смерти ребенка».

В 2015 году в Казахстане был внедрен хромосомный микроматричный анализ (ХМА) - полногеномный молекулярно-генетический метод, являющийся золотым стандартом в постнатальной и в пренатальной диагностике, который диагностирует более 245 цитогенетически значимых синдромов, 980 наследственных заболеваний. ХМА основан на новой технологии использования ДНК-чипов (микроматриц), на которую нанесено 2,7 миллиона отдельных ДНК зондов, каждый из которых определяет наличие или отсутствие в геноме очень маленькой последовательности размером в 25 нуклеотидов [12].

Преимуществом микроматричного анализа является высокая точность и диагностическая значимость, отсутствие ложных результатов и скорость выполнения исследования. Полученные результаты ХМА врач-генетик интерпретирует, используя мировые научные базы (OMIM, PubMed, DGV, UCSC), содержащие последние сведения об исследуемых полиморфизмах. Ограничением метода ХМА является невозможность диагностировать сбалансированные хромосомные перестройки, а также точечные однонуклеотидные замены. [13,14].

**Цель исследования:** оценить диагностическую значимость aCGH метода сравнительной геномной гибридизации в оценке вклада хромосомных аномалий в развитие генетических нарушений.

**Материалы и методы исследования.** На базе Центра Молекулярной Медицины проведено 28 исследований, выполненных методом сравнительной геномной гибридизации с использованием микроматрицы CGX™- HD (4 x 180 K), программного обеспечения Genoglyphix® и сканера микроматриц ScanRI (PerkinElmer, Финляндия).

Материалы исследования: венозная кровь, ворсины хориона, бластомеры или полярное тельце. Выделение ДНК проводилось на автоматическом анализаторе Prepito (Perkin Elmer). Концентрацию ДНК измеряли на Spectrophotometer NanoDropLite с определением степени очистки ДНК  $\geq 1,60$ .

Для проведения сравнительной геномной гибридизации 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. 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 гибридизацию смеси меченых ДНК с зондами на микроматрице. Результаты гибридизации оценивают с помощью сканера, снимающего количественные показатели флуоресценции для каждой ячейки микроматрицы по двум каналам. 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 [15, 16].

**Результаты исследования.** Проведен ХМА 120 пациентам, показания для проведения представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Показания и результаты хромосомного микроматричного анализа

| Показания  | Количество пациентов | Выявлены хромосомные нарушения | Результат   |
|--|----------------------|--------------------------------|---|
| МВПР   | 8 (6,7%)             | 6 (75%)                        | Синдром Смита-Лемли-Опитца 11q13.4; Синдром Корнелии де Ланге, делеция 5p13.2; Микроделеция 8p11.22; 5q22.3; Микроделеция   |
| Недифференцированная умственная отсталость                             | 16 (13,3%)           | 10 (62,5%)                     | X-сцепленная с геном FMR1 Xq27.3; X-сцепленная с геном CASK; Микроделеция 14q11.2; Микроделеция 11p11.2; Микроделеция 16p12.2; Микродупликация 8p11.22.   |
| Расстройства аутистического спектра и задержка психомоторного развития | 13 (10,8%)           | 9 (69,2%)                      | Микроделеция Xq28; X-сцепленная с геном FMR1 Xq27.3; X-сцепленная умственная отсталость, обусловленная делецией xp22.33-p11.21; 14q32.33 интерстициальная микродупликация; Микроделеция 2q37.3; Микроделеция 2q37.3 |
| Предполагаемое наследственное заболевание                              | 27 (22,5%)           | 12 (44,5%)                     | Синдром Куррарино (делеция); Синдром Ди Джорджи (делеция); Миодистрофия Дюшенна (дупликация)  |
| Предполагаемое нервно-мышечное заболевание                             | 7 (5,8%)             | 3 (43%)                        |   |
| Наличие хромосомного или моногенного заболевания в семье               | 9 (7,5%)             | 0                              |   |
| Бесплодие и/или отягощенный акушерский анамнез                         | 3 (2,5%)             | 2 (66,7%)                      |   |
| Эпилепсия, судорожный синдром  | 34 (28,3%)           | 15 (44,1%)                     |   |
| Пренатальная, предимплантационная диагностика                          | 3 (2,5%)             | 2 (66,7%)                      |   |
| <b>ВСЕГО</b>   | <b>120 (100%)</b>    | <b>59 (49%)</b>                |   |

Как видно из таблицы 1, основным показанием для проведения ХМА явились эпилепсия – 28,1%; предполагаемая наследственная моногенная патология – 22,5% и недифференцированная умственная отсталость – 13,3%. Средний возраст пациентов составил 11,3±0,8 лет.

Результаты ХМА показали, что наибольший вклад хромосомных нарушений отмечен у пациентов с множественными пороками развития – 75%, далее следует группа пациентов с расстройствами аутистического спектра и/или задержкой психомоторного развития – 69,2%, с недифференцированной умственной отсталостью – 62,5%. Число пациентов, прошедших ХМА по поводу бесплодия, отягощенного акушерского анамнеза, пренатально или предимплантационно в программе ЭКО, оказалось недостаточным для проведения статистического анализа. Таким образом, из 120 обследованных, хромосомная или синдромальная наследственная патология выявлена у 59 (49%), что дало возможность установить точный генетический диагноз, оценить повторный генетический риск и провести пренатальную диагностику при последующих беременностях в этих семьях.

*Клинический случай 1.*

Пациентка О., 35 лет, брак не родственный. Беременность 3. 1-ая беременность – 2006 г., срочные роды, мальчик имеет задержку психомоторного развития. Результат хромосомного микроматричного анализа выявил дупликацию 14q32.33. 2-ая беременность – в 2008 г., самопроизвольный выкидыш в сроке 8 недель. При данной беременности (9-10 недель) проведена инвазивная пренатальная диагностика – биопсия хориона с последующим микроматричным анализом. Показание – наличие ребенка с задержкой психомоторного развития. Результат ХМА: Синдром Куррарино. Микроделеция 7q36.3. Размер 0.010 Мб. Гены, расположенные в районе дисбаланса: MNX1, LOC645249. 14q32.33 интерстициальная микродупликация. Размер 0,79 Мб. Заключение УЗИ: Беременность 15-16 недель. Агенезия крестца.

Беременность была прервана на сроке 17-18 недель. Проведена патологоанатомическая верификация и рентгенография абортуса. Диагноз агенезии крестца подтвержден. В научной литературе – это первый случай с-ма Куррарино, диагностированный микроматричным методом в такие ранние сроки беременности.

#### Клинический случай 2.

Пациент С., 11 лет. В МГК обратились родители мальчика по поводу задержки психоречевого развития. Длительное время находился на диспансерном учете у детского невролога с диагнозом «Аутизм» с 5 лет, судорог не отмечалось. Жалобы впервые возникли в 3 года. До настоящего времени медико-генетическую консультацию не получал. Из анамнеза: мальчик от родителей, не состоящих в кровнородственном браке, от 3-ей беременности, 2-х срочных родов. Фенотипически: пробанд мальчик, правильного телосложения, повышенного питания, рост -1.48 см, вес - 54 кг, брахицефалия, гипотелоризм, макростомия, оттопыренные, большие ушные раковины, короткая шея, наружные половые органы сформированы по мужскому типу, гипопластичны. Наблюдается эмоциональная неустойчивость, склонность к гетерагрессии. Кариотип 46, XY.

Для уточнения диагноза было принято решение о проведении ХМА. Результат ХМА: X-сцепленная умственная отсталость, обусловленная делецией Xq11.1-q28. Размер 93.06 Mb. Выявленное нарушение идентифицировано как причина данной патологии (рисунок 1).

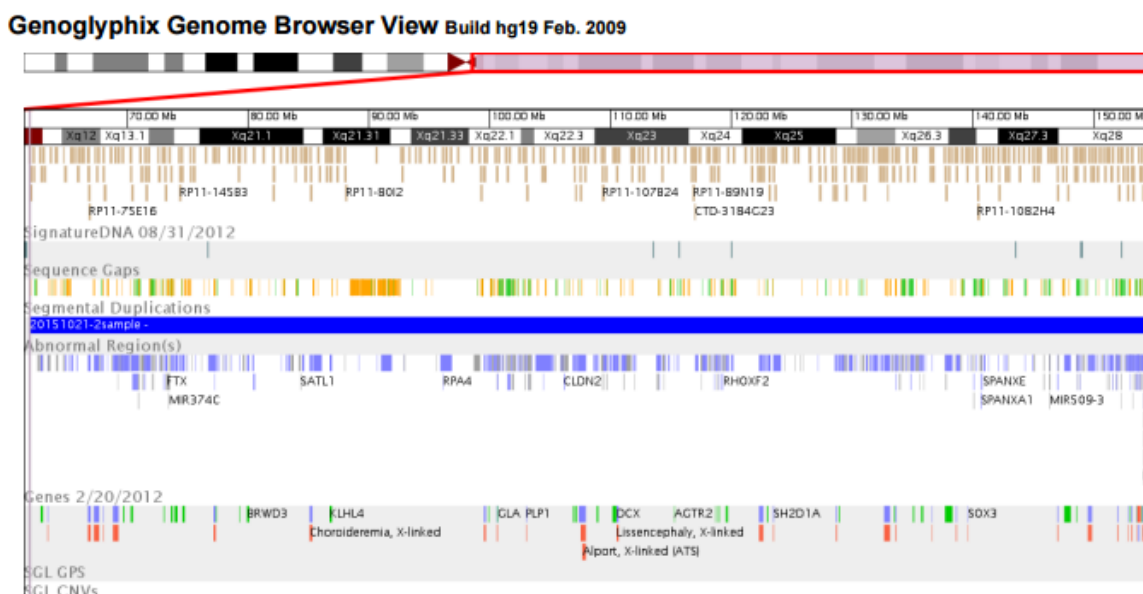


Рисунок 1 – Пациент С., делеция Xq11.1-q28

**Заключение.** Первые результаты проведения ХМА в диагностике хромосомных аномалий в развитие генетических заболеваний, показали его высокую диагностическую значимость. CGH тест позволил выявить хромосомные нарушения у 30-65% детей с врожденными пороками развития, у 69% детей расстройствами аутистического спектра, в 43% случаев наследственных нейромышечных заболеваний, а также у 62% пациентов с недифференцированной умственной отсталостью. Полученные результаты подтверждают необходимость использования ХМА в качестве первого теста в пре- и постнатальной диагностике генетических нарушений.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Гнетецкая В.А., Курцер М.А., Мальмберг О.Л. и др. Ранняя диагностика хромосомной патологии плода по программе OSCAR // Акушерство и гинекология. - 2010. - №1. - С.24-28
- 2 Görker I, Gürkan H, Demir Ulusal S, Atlı E, İkbāl Ath E. A 9-year-old-girl with Phelan McDermid Syndrome, who had been diagnosed with an autism spectrum disorder // Balkan J. Med. Genet. - 2017. - Vol. 19(2). – P.85-90.
- 3 Shah M, Cinnioğlu C, Maisenbacher M, Comstock I, Kort J, Lathi R. Comparison of cytogenetics and molecular karyotyping for chromosome testing of miscarriage specimens // Fertil. Steril. - 2017. - Vol.7. – P.15-28.
- 4 Dagklis T, Papageorgiou E., Siomou E., Paspaliaris V., Zerva C., Chatzis P., Thomaidis L., Manolakos E., Papoulidis. Prenatal diagnosis of 1p34.3 interstitial microdeletion by aCGH in a fetus with jaw bone abnormalities // I.Mol. Cytogenet. – 2016. - №6 – P.9-77.
- 5 Wang H, Liu L, Wu D, Li T., Cui C., Zhang L., Wang C. Clinical and molecular cytogenetic analyses of four families with 1q21.1 microdeletion or microduplication // J. Gene Med. - 2017. - №2. – P. 116-121.
- 6 Староверова Е. Г. Пренатальная диагностика хромосомной патологии: Автореф. дисс. ... канд.мед.наук - Нижний Новгород, 2003. – 48 с.
- 7 Chen C., Chern S., Chang T., Tzen C., Lee C., Chen W., Lee M., Wang W. Prenatal diagnosis of de novo terminal deletion of chromosome 7q // Prenat. Diagn. - 2003. - V.23. - №5. - P.375-379.

- 8 Гайнер Т. А. Оптимизация диагностики хромосомных аномалий человека: Автореф. дисс. ... канд.биол.наук - Новосибирск, 2004. - 82 с.
- 9 Fiorentino F., Napolitano S., Caiazzo F., Sessa M., Bono S., Spizzichino L., Gordon A., Nuccitelli A., Rizzo G., Baldi M. // Eur. J. Hum. Genet. - 2013. - 21(7). - P. 725-730.
- 10 Capalbo A., Bono S., Spizzichino L., Biricik A., Baldi M., Colamaria S., Ubaldi F., Rienzi L., Fiorentino F. Sequential comprehensive chromosome analysis on polar bodies, blastomeres and trophoblast: insights into female meiotic errors and chromosomal segregation in the preimplantation window of embryo development // Hum. Reprod. - 2013. - 28(2). - P. 509-518.
- 11 Milano I., Babbucci M., Cariani A., Atanassova M., Bekkevold D., Carvalho G., Espiñeira M., Fiorentino F., Garofalo G., Geffen A., Hansen J., Helyar S. et al. Outlier SNP markers reveal fine-scale genetic structuring across European hake populations (*Merluccius merluccius*) // L. Mol. Ecol. - 2014. - 23(1). - P.118-135.
- 12 Miller D., Adam M., Aradhya S., Biesecker L., Brothman A., Carter N., Church D., Crolla J., Eichler E., Epstein C., Faucett W., Feuk L., Friedman J., Hamosh A., Jackson L., Kaminsky E., Kok K., Krantz I., Kuhn R., Lee C., Ostell J., Rosenberg C., Scherer S., Spinner N., Stavropoulos D., Tepperberg J., Thorland E., Vermeesch J., Waggoner D., Watson M., Martin C., Ledbetter D. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies // Am. J. Hum. Genet. - 2010. - 86(5). - P. 749-764.
- 13 Miller D. Genetic testing for autism: recent advances and clinical implications // Expert. Rev. Mol. Diagn. - 2010. - 10(7). - P. 837-840.
- 14 Xiang B., Zhu H., Shen Y., Miller D., Lu K., Hu X., Andersson H., Narumanchi T., Wang Y., Martinez J., Wu B., Li P., Li M., Chen T., Fan Y. Genome-wide oligonucleotide array comparative genomic hybridization for etiological diagnosis of mental retardation: a multicenter experience of 1499 clinical cases // J. Mol. Diagn. - 2010. - 12(2). - P. 204-212.
- 15 Keren B., Le Caignec C. Oligonucleotide microarrays in constitutional genetic diagnosis // Expert Revue Mol. Diagn. - 2011. - Vol. 11. - №5. - P. 521-532.
- 16 Shinawi M., Cheung S. W. The array CGH and its clinical applications // Drug Discovery Today. - 2008. - Vol.13. - P. 17-18.

**Г.С. Святова, Г.М. Березина, Г.К. Мусабалаева, А. Т. Садырбекова**  
**ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНДАҒЫ САЛЫСТЫРМАЛЫ ГЕНОМДЫҚ ГИБРИДИЗАЦИЯНЫҢ ТОЛЫҚ**  
**ГЕНОМДЫ-ACGH ӘДІСІНІҢ АЛҒАШҚЫ НӘТИЖЕЛЕРІ**

**Түйін:** Акушерлік, гинекология және перинатология ғылыми орталығы, ҚР ДСМ, Республикалық медициналық-генетикалық кеңесі

Қысқаша мазмұндама. aCGH - кең ауқымды хромосомалық аурулардың толық геномды сканерлеу үшін қазіргі заманғы және жоғары тиімді тәсіл болып табылады. Осы әдісті пайдаланған кезде жоғары тиімділікпен сандық, негізгі құрылымдық хромосомалық аномалияларымен бірге микроделеция және микродупликация анықтау мүмкіндігі бар. Мақалада диагностикалық жағдайлардың мысалдары беріледі.

**Түйінді сөздер:** салыстырмалы геномдық гибридизация, микроделеция, көптік туа пайда болған ақаулар.

**G. Svyatova, G. Berezina, G. Musabalayeva, A. Sadyrbekova**  
**THE FIRST RESULTS OF ACGH OF THE FULL GENOMIC METHOD OF COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION**  
**IN THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN**

**Resume:** Scientific Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan Republican Medical Genetic Consultation aCGH is a modern and highly efficient approach for full-genomic scanning of a wide range of chromosomal abnormalities.

When using this method, with high efficiency detected as numerical karyotype anomalies, and major structural chromosome aberrations, detected in standard karyotyping and microdeletion and microduplication, affecting only certain segments of chromosomes.

The article will give examples of diagnostic cases.

**Keywords:** comparative genomic hybridization, microdeletions, multiple congenital malformations.