

Медицинская генетика

Методы анализа кариотипа человека

- стандартные цитогенетические,
- молекулярно-цитогенетические,
- молекулярные методы.

Показания для проведения цитогенетической ДИАГНОСТИКИ (Наследственные болезни: национальное руководство)

1	Нарушения репродуктивной функции неясной этиологии у мужчин и женщин:
1.1	спонтанные аборты (два и более) на разных сроках беременности, мертворождения или рано умершие дети;
1.2	первичная аменорея;
1.3	Мужское и женское бесплодие при исключении гинекологических заболеваний у женщин;
2	Множественные врожденные пороки развития у ребенка
3	Задержка умственного и физического развития у ребенка
4	Подозрение на хромосомную болезнь на основании клинических симптомов

Показания для проведения цитогенетической ДИАГНОСТИКИ (Наследственные болезни: национальное руководство)

5	Пренатальная и предимплантационная диагностика при повышенном генетическом риске
6	Подозрение на синдромы, характеризующиеся хромосомной нестабильностью (учет хромосомных aberrаций и сестринских хроматидных обменов)
7	Гемобластозы и онкологические заболевания
8	Оценка мутагенных воздействий

Цитогенетическая диагностика

Метафазные хромосомы

Стандартные методы цитогенетического анализа (культивирование клеток, приготовление препаратов хромосом, дифференциальное окрашивание), молекулярно-цитогенетические методы

Хроматин интерфазных ядер, молекулы ДНК

Методы молекулярно-цитогенетического и молекулярного анализа

Цитогенетическая диагностика может быть выполнена на разных стадиях онтогенеза человека:

- ✓Преимплантационная
- ✓Предимплантационная
- ✓Пренатальная
- ✓Постнатальная

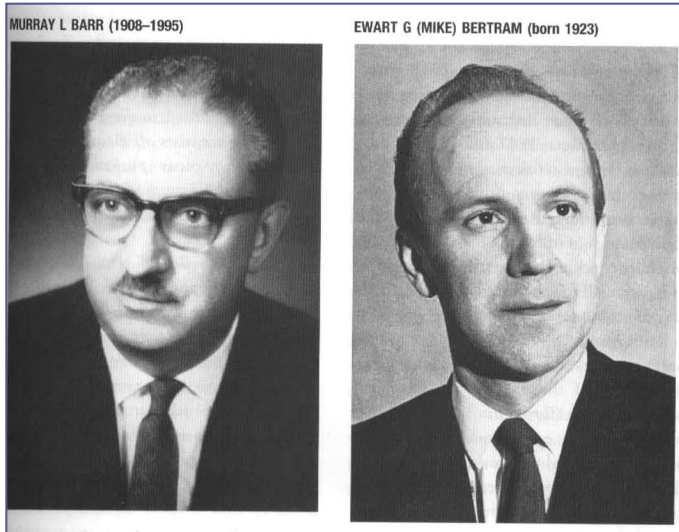
Конститутивный кариотип

Онкоцитогенетика – анализ кариотипа отдельных соматических клеток

Методы анализа кариотипа

- **Цитологическое исследование полового хроматина** в ядрах клеток букального эпителия (экспресс-анализ аномалий половых хромосом)
- **Стандартное цитогенетическое исследование** – анализ метафазных хромосом с помощью методов дифференциального окрашивания («золотой стандарт»)
- **Молекулярно-цитогенетическое исследование** (*FISH* – флуоресцентная *in situ* гибридизация специфических ДНК-проб с ДНК метафазных или интерфазных хромосом)
- **Молекулярные методы исследования** (array-CGH – сравнительная геномная гибридизация на микроматрицах; QF-PCR – количественный анализ полиморфных локусов хромосом, NGS – анализ количественных нарушений методами секвенирования)

Краткая историческая справка



Murray L Barr, Ewart G (Mike) Bertram, 1949 г. – описание полового хроматина в интерфазных ядрах клеток.

Mary Lyon, 1961 – выдвинута гипотеза случайной инактивации X хромосомы

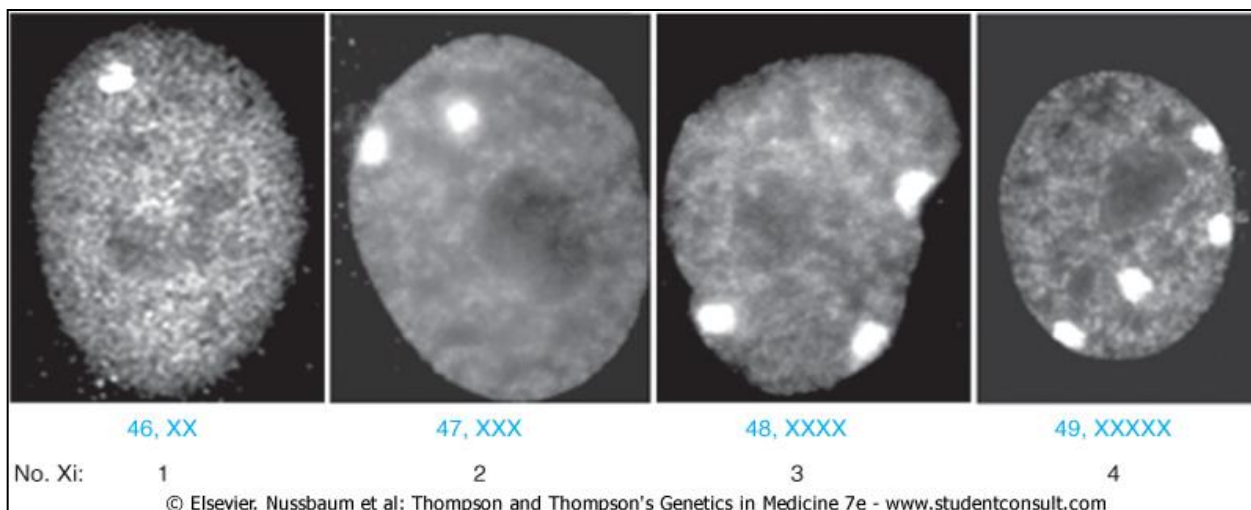


Цитологическое исследование полового хроматина

Экспресс-диагностика аномалий в системе половых хромосом. Как правило выполняется на ядрах клеток буккального эпителия.



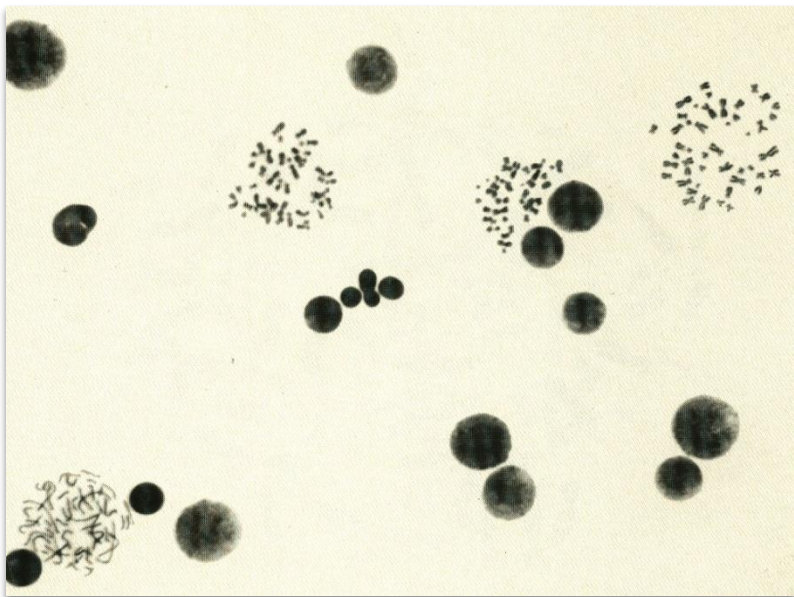
Нативное окрашивание ацеторсеином



Иммунофлуоресцентное окрашивание гистона масоH2A, связанного с неактивной X-хромосомой

Кариотипирование – диагностическое исследование хромосом пациента, которое включает в себя определение числа хромосом (исключение геномных мутаций) и анализ структуры хромосом (исключение хромосомных мутаций)

Стадия клеточного цикла



Методы получения препаратов хромосом

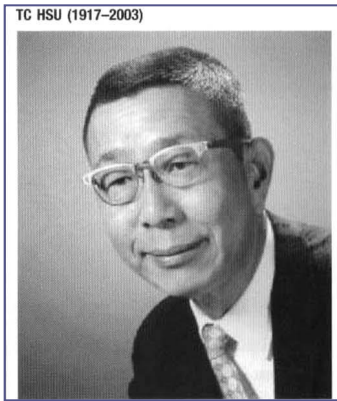
Прямые: используются клетки, делящиеся *in vivo*

- клетки костного мозга,
- клетки цитотрофобласта

Непрямые: используются клетки, делящиеся *in vitro*

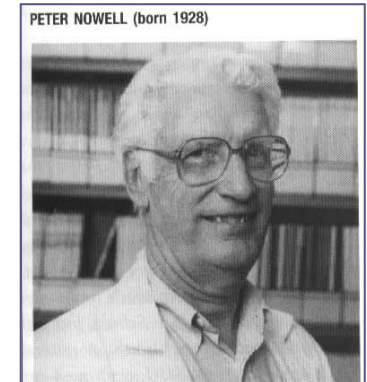
- лимфоциты периферической крови
- фибробласты кожи
- амниоциты

Краткая историческая справка



TC Hsu, 1952 – внедрение гипотонической обработки клеток при приготовлении препаратов хромосом, начало «новой эры» в истории цитогенетики.

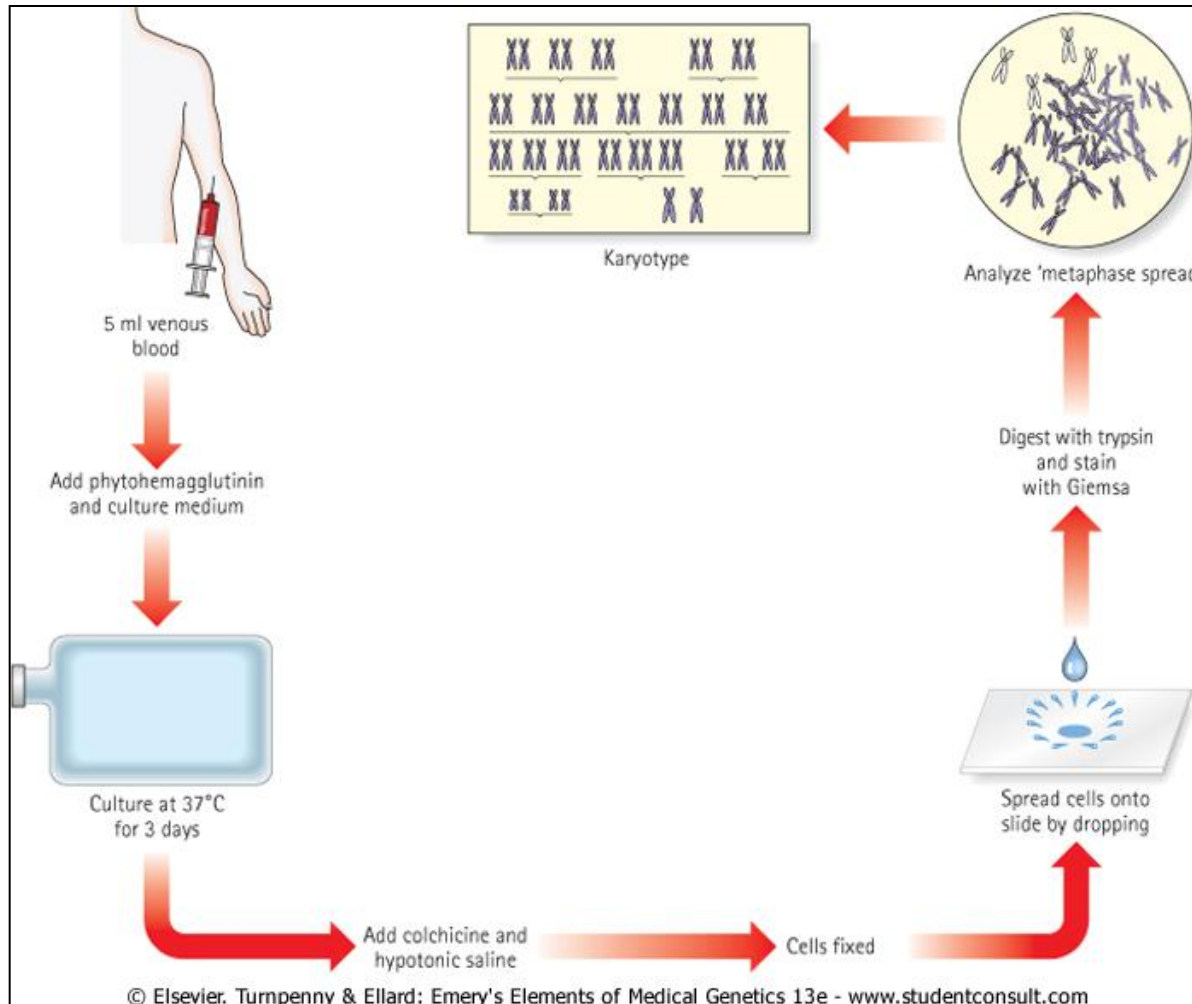
Peter Nowell, 1960 – использование фитогемагглютинина в качестве митогена при культивировании лимфоцитов.



Torbjörn Caspersson, 1969-1971 гг. – разработка метода дифференциального окрашивания хромосом.

Стандартное кариотипирование

Культивирование лимфоцитов периферической крови



Требования к биологическому материалу:

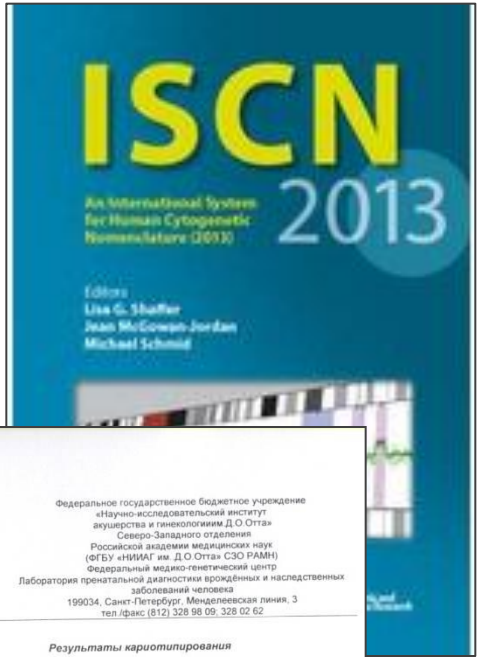
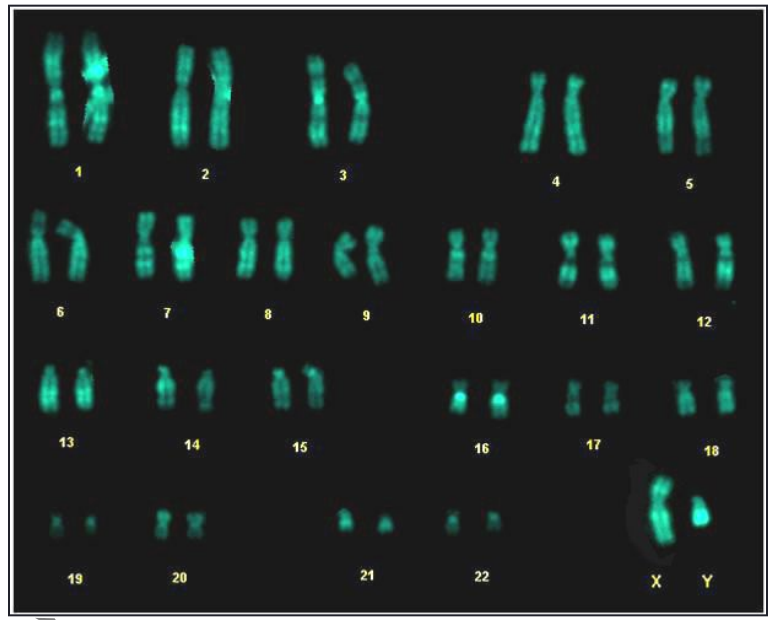
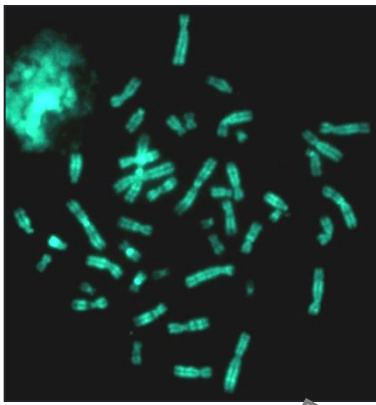
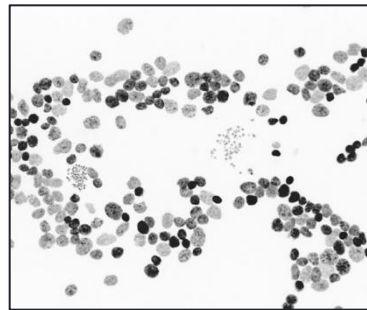
1. Использование антикоагулянта (гепарина)
2. Стерильность

Культура лимфоцитов:

- Кратковременная (72 ч)
- Митоген (ФГА)
- Цитостатик (колхицин)
- Гипотоническая обработка клеток
- Фиксация клеток
- Приготовление препаратов

Стандартное кариотипирование

1. Получение препаратов метафазных хромосом
2. Дифференциальное окрашивание хромосом
3. Микроскопический анализ числа и структуры хромосом
4. Цитогенетическое заключение



Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта» Северо-Западного отделения Российской академии медицинских наук (ФГБУ «НИИАГ им. Д.О. Отта» СЗАО РАМН) Федеральное медико-генетическое учреждение «Центр пренатальной диагностики врожденных и наследственных заболеваний человека» 199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, 3 тел./факс: (812) 328 98 09, 328 02 62

Результаты кариотипирования

ФИО: [Redacted]

Дата рожд. 01.07.1971 г.р.

Направлен Дата получения образца 12.05.2014

Лаб.индекс 14-11097

Методы анализа ФГА-стимулированные лимфоциты периферической крови, (дифференциальная окраска хромосом QF/ACD), QAS 6

Число метафаз 15

Анализ выполнил Врач-лаборант Дудкина В.С.

Кариотип 46,XY

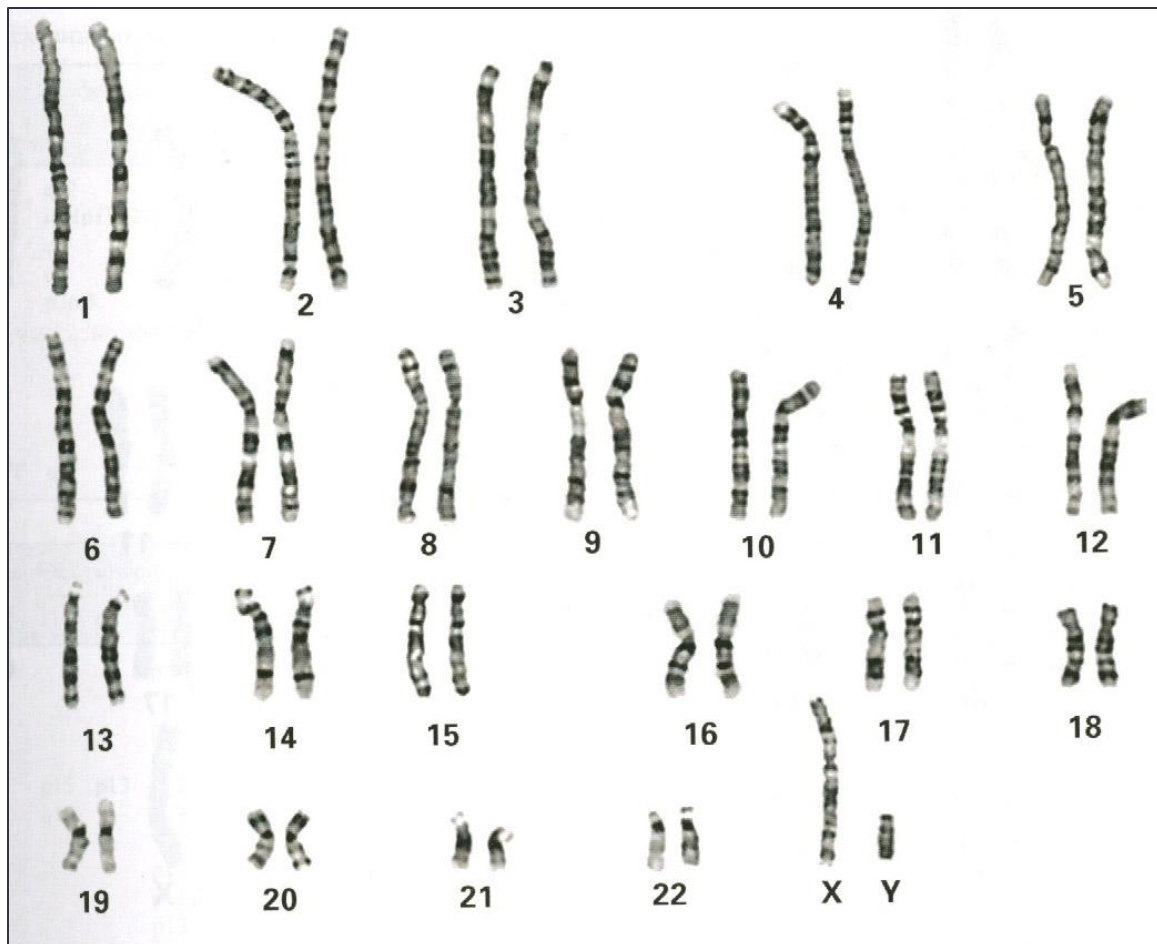
Заключение Кариотип нормальный мужской

Руководитель цитогенетической группы, д.б.н., в.н.с. Т.В. Кузнецова

* 27 * _____ 05 _____ 2014

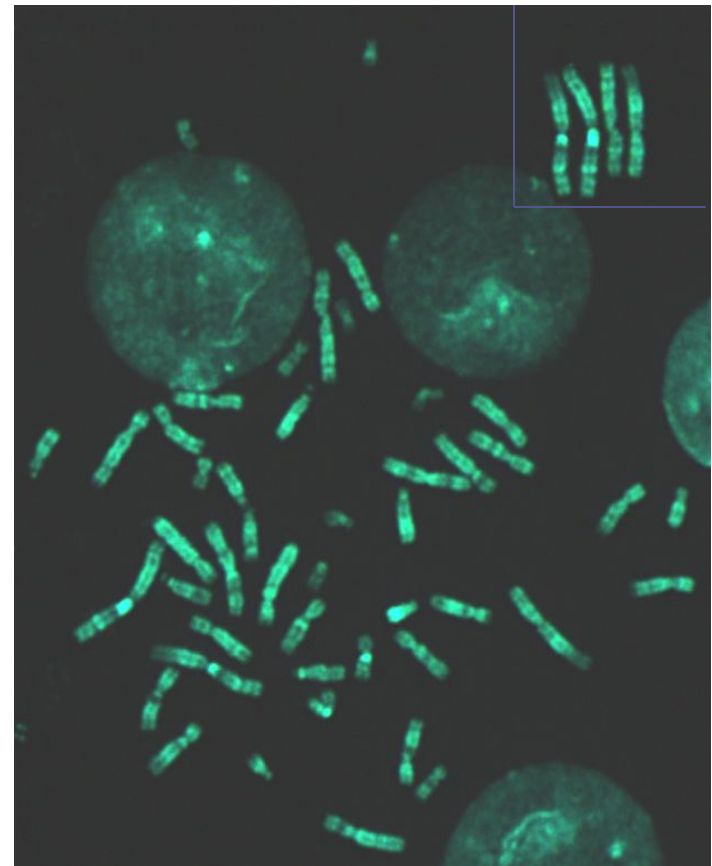
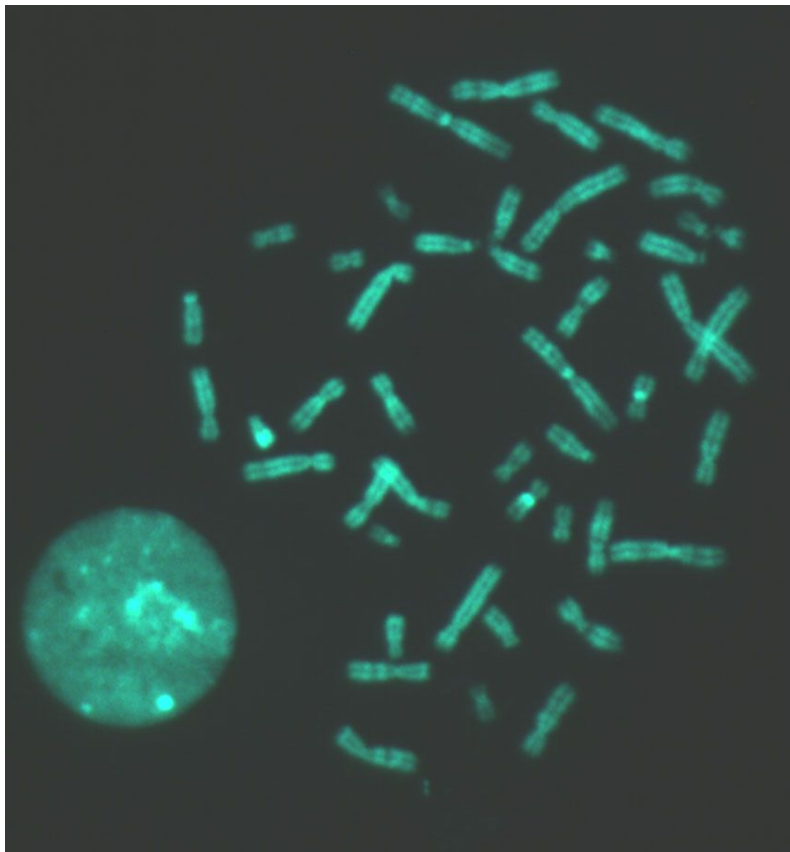
Методы дифференциального окрашивания хромосом

G-окрашивание красителем Гимза после обработки протеолитическим ферментом трипсином (GTG)



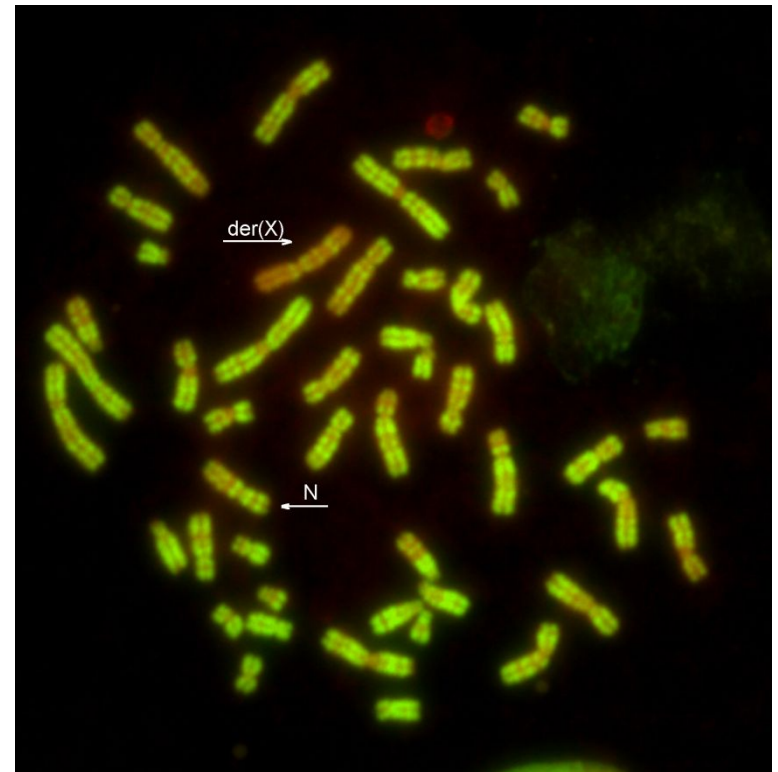
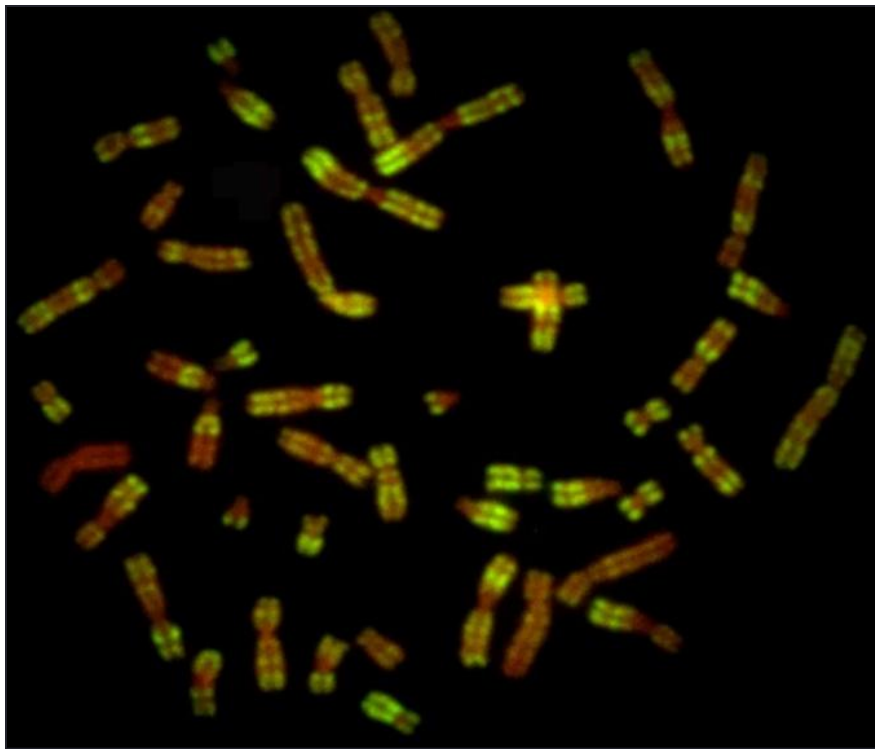
Методы дифференциального окрашивания хромосом

Q-окрашивание флуорохромом Hoechst 33258 с контрастированием Actinomycin D (QFH/AcD)

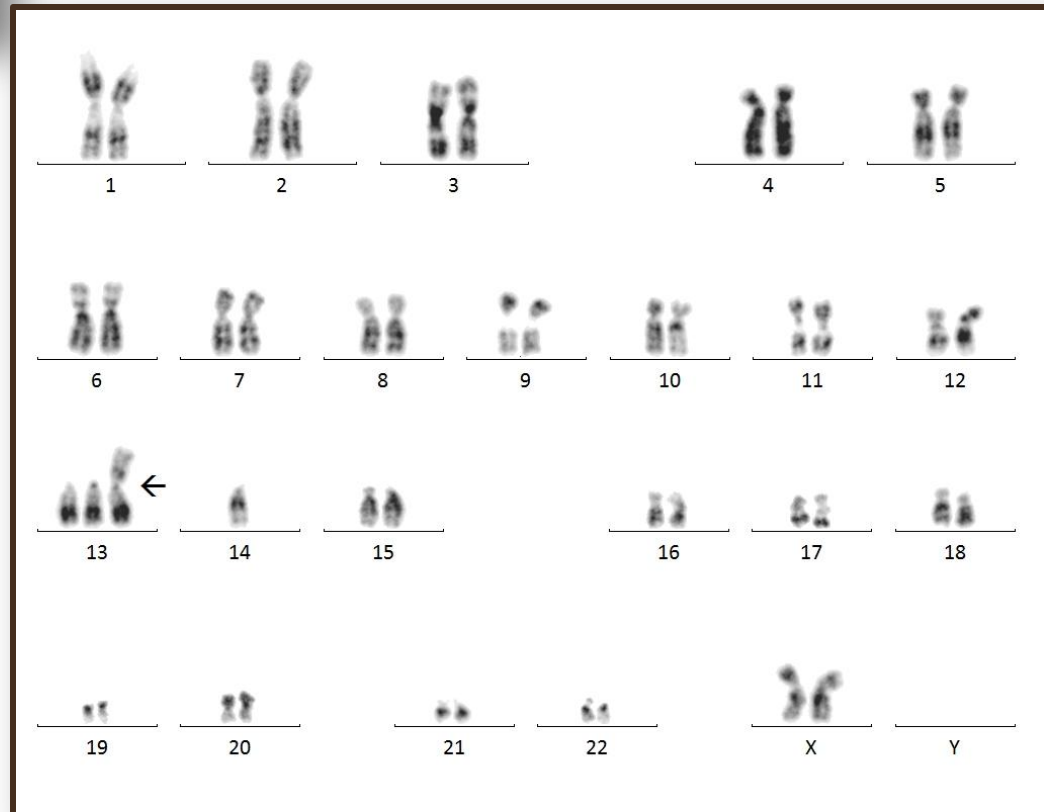
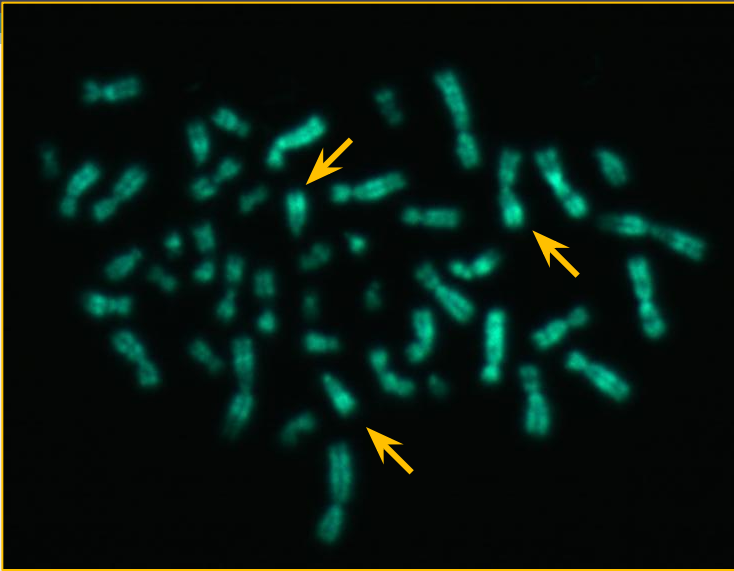


Методы дифференциального окрашивания хромосом

R-окрашивание красителем акридиновый оранжевый с использованием бромдезоксисуридина во второй половине S-периода (RBA). Идентификация инактивированной X хромосомы



Цитогенетическое исследование абортного материала при диагнозе замершая беременность раннего срока



Результат

кариотипирования:

46,XX,+13,der(13;14)(q10;q10)

Заключение:

В клетках цитотрофобласта ворсинчатого хориона выявлена транслокационная форма трисомии по аутосоме 13 (синдром Патау)

Рекомендации:

1. Кариотипирование супружеской пары
2. Консультация врача-генетика

С помощью методов стандартного кариотипирования

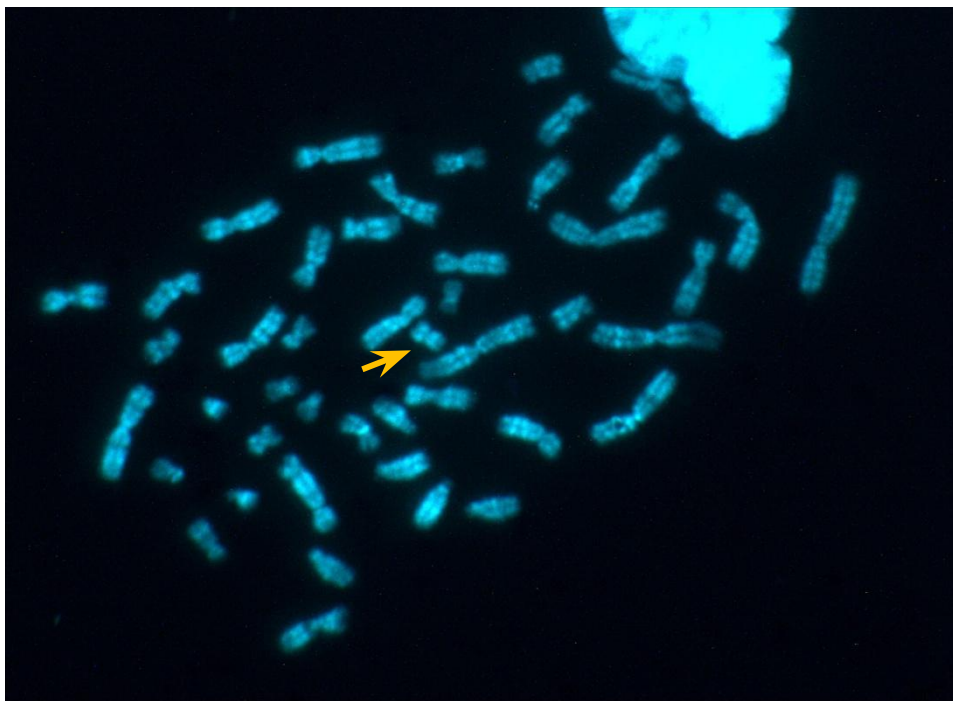
МОЖНО:

- идентифицировать все числовые аномалии целых хромосом
- выявить структурные перестройки хромосом на уровне разрешения 300-850 блоков на гаплоидный набор
- выявить хромосомный мозаицизм при определенном количестве анализируемых клеток

НЕЛЬЗЯ:

- выявить нарушения в кариотипе неделящихся клеток
- в большинстве случаев достоверно установить микроделецию или микродупликацию
- установить природу добавочного материала и маркерных хромосом

Маркерная хромосома



ПД: плацентобиопсия на сроке 15/16 недель
Показания - возраст, БХМ I триместра (1,0/3,86), риск 1:133

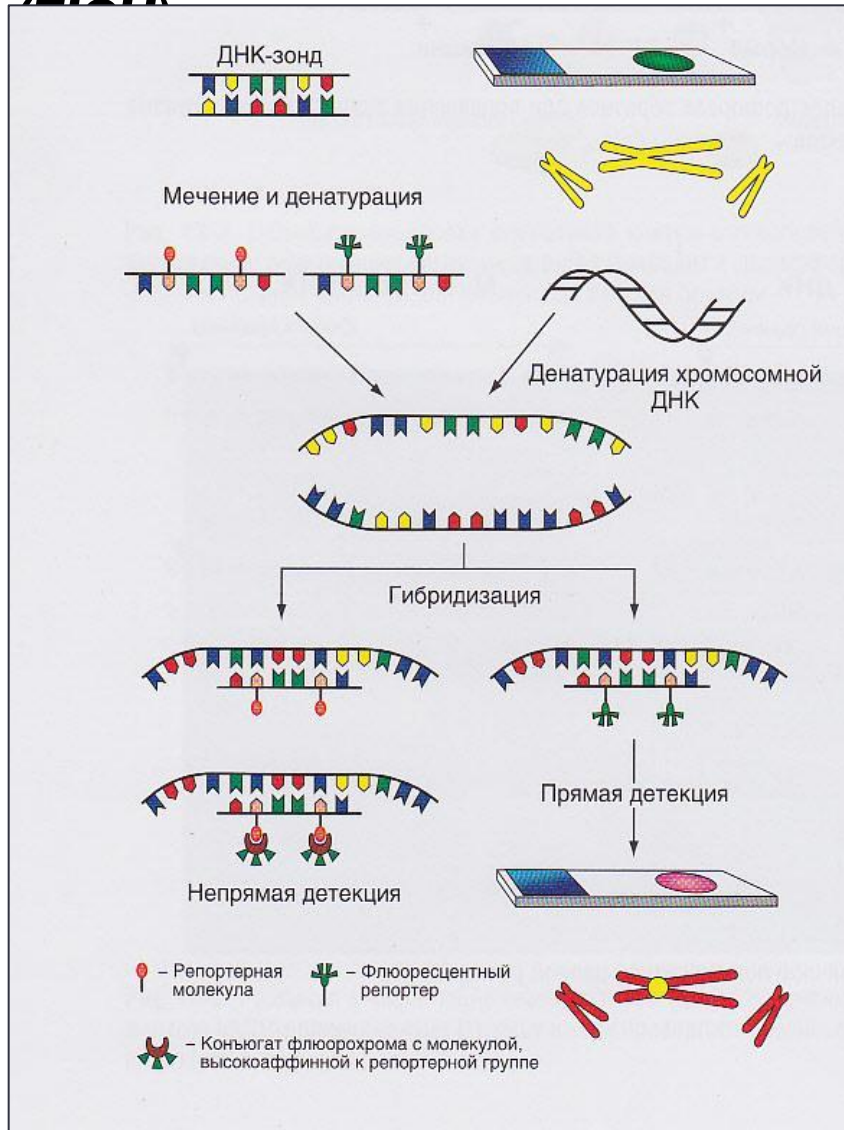
Кариотип в клетках цитотрофобласта – 47,XX,+mar[21]/46,XX[8]

Рекомендации:

- 1. Молекулярно-цитогенетическая диагностика (FISH) для установления природы маркерной хромосомы**
- 2. Кордоцентез**

Молекулярно-цитогенетическая диагностика

Fluorescent in situ hybridisation



□ Подготовка цитологического препарата

□ Выбор и подготовка ДНК-пробы

□ Обработка препарата перед гибридизацией

□ Проведение гибридизации *in situ*

□ Постгибризационная обработка препарата

□

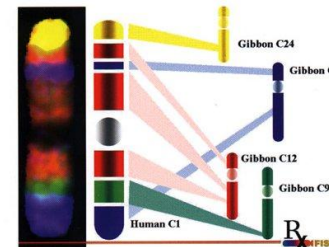
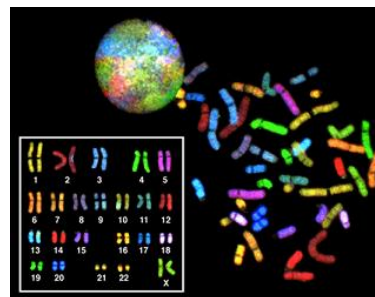
□

и

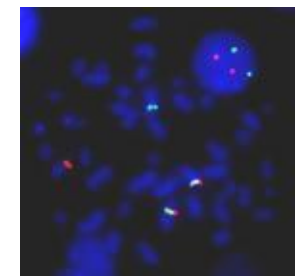
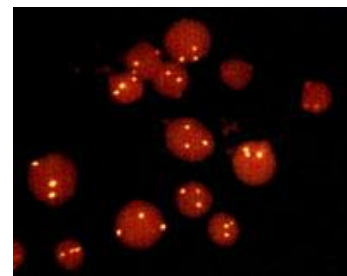


Развитие методов молекулярной цитогенетики на основе технологии *FISH*

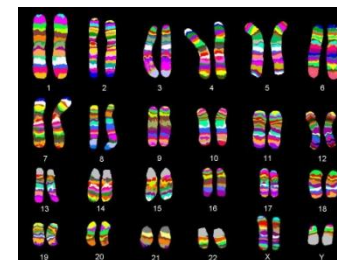
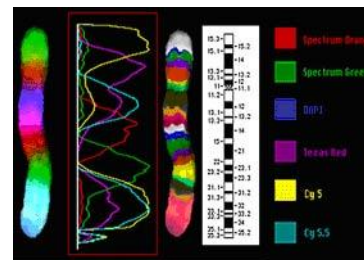
- Методы общего анализа кариотипа (многоцветная *FISH*, *SKY*, *RxFISH*, *CGH*)



- Методы селективного хромосомного анализа (анализ численных и структурных аномалий конкретных хромосом)



- Методы общего анализа индивидуальных хромосом (multi color banding, «обратная» *FISH*)



ДНК-зонды

❖ CEP (Chromosome Enumeration Probe)

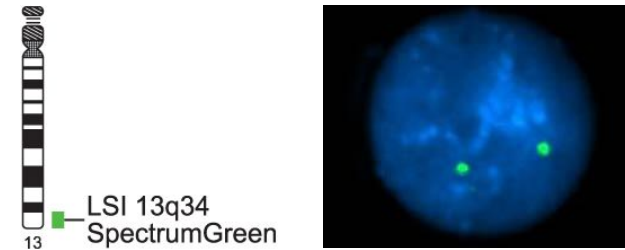
- α- сателлитная ДНК (центромеры)
- β- сателлитная ДНК (1, 9, 16, 15, Y)



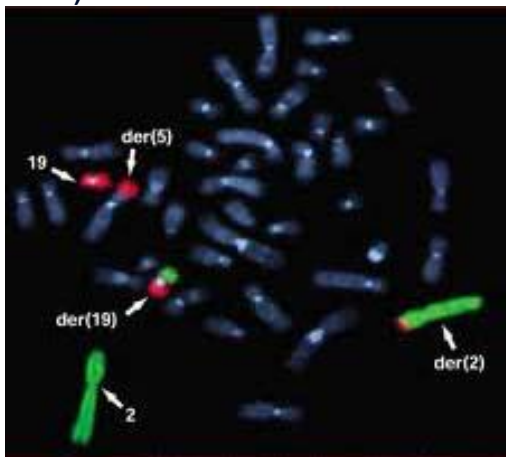
CEP9 CEP15 LSI5p15.2 CEPX CEPY CEP18

❖ LSI (Locus Specific Identifier)

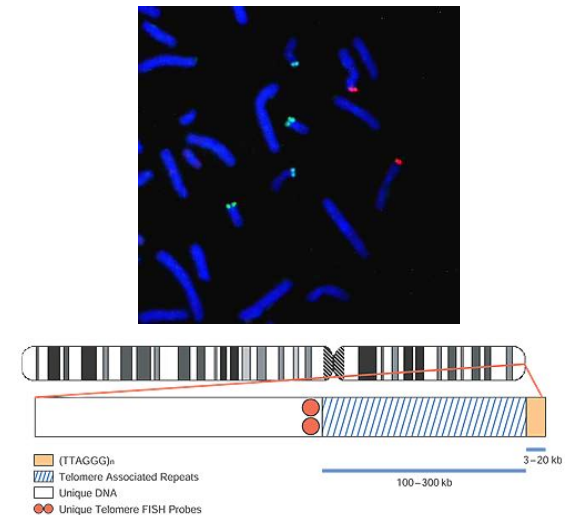
- микроделеционные пробы
- онкологические пробы



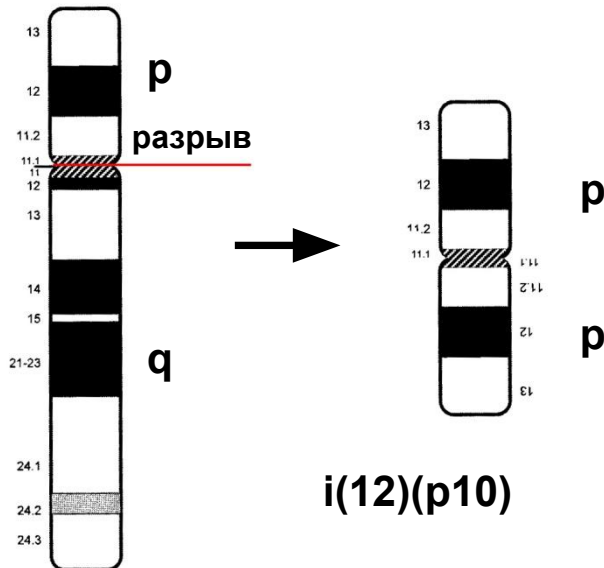
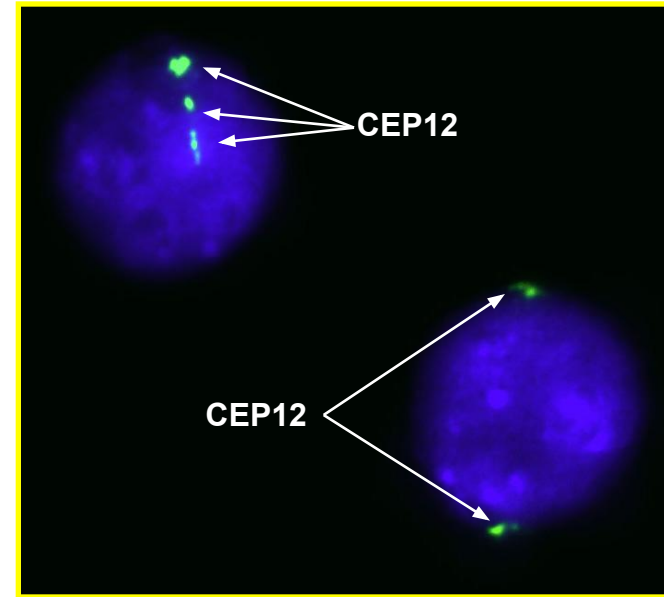
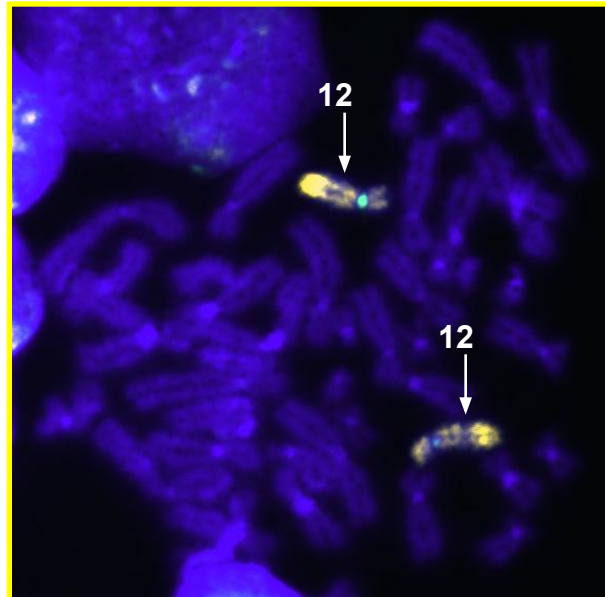
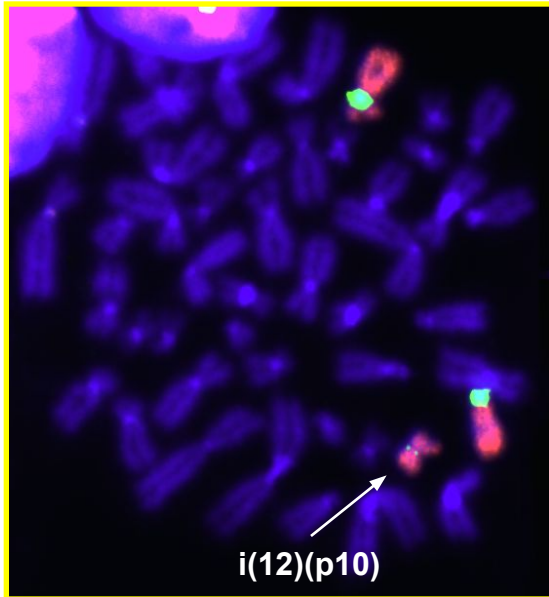
❖ WCP (Whole Chromosome Paints)



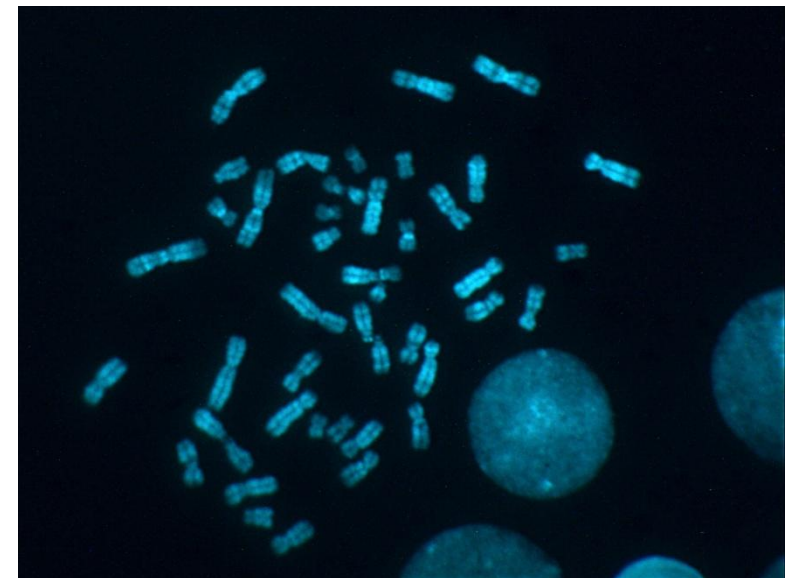
❖ TEL (Telomere probe)



Синдром Паллистера-Киллиана: дополнительная изохромосома по короткому плечу хромосомы 12



Хромосома 12



Лимфоцит крови – 46,XX

С помощью метода FISH

МОЖНО

- исследовать хромосомы неделящихся клеток
- выявить анеуплоидию по интерфазным ядрам
- выявить и уточнить выявленный хромосомный мозаицизм
- уточнить точки разрывов при структурных перестройках хромосом
- установить природу добавочного хромосомного материала и маркерных хромосом
- выявить микрперестройки хромосом (при предполагаемом диагнозе)

НЕЛЬЗЯ

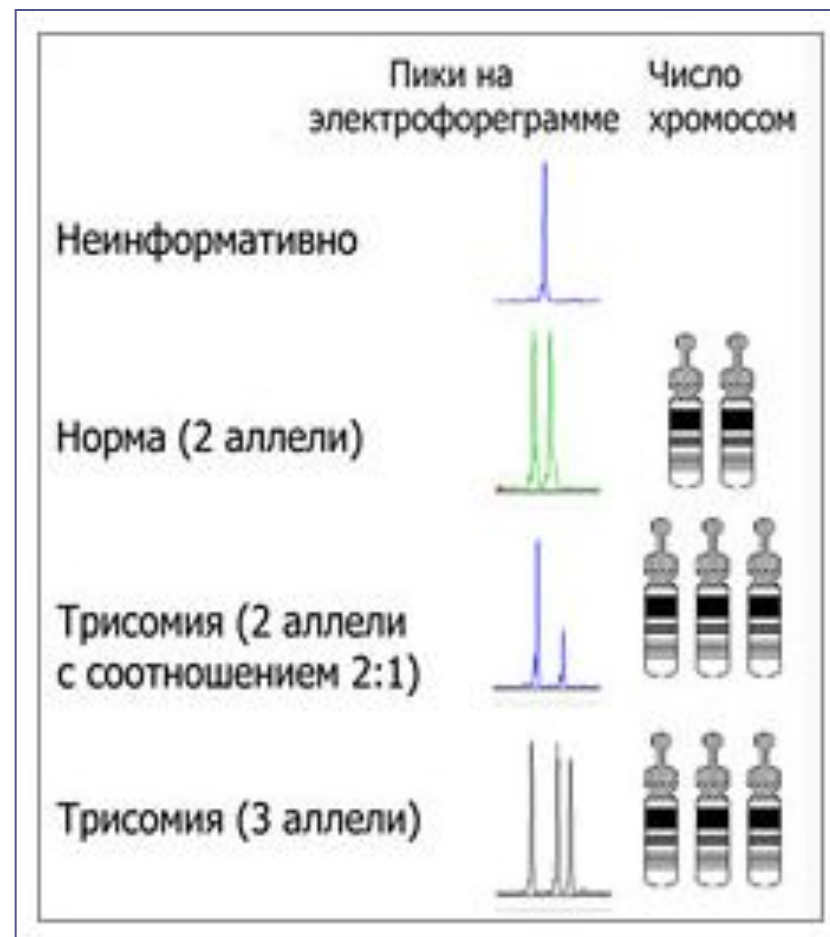
- провести полное исследование всех хромосом набора (анализируется конкретный локус конкретной хромосомы)

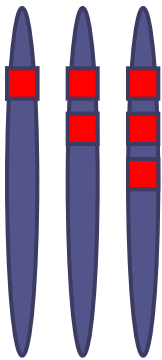
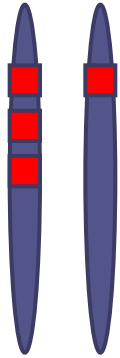
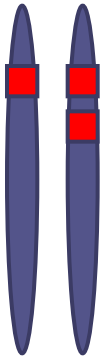
Молекулярно-биологические методы:

QF-PCR

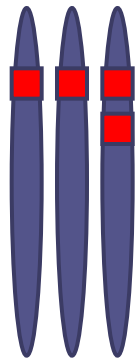
(КФ-ПЦР количественная флуоресцентная полимеразная цепная реакция)

- ✓ *КФ-ПЦР позволяет проводить молекулярный анализ анеуплоидий на некультивируемых эмбриональных клетках.*
- ✓ *Принцип КФ-ПЦР основан на анализе высокополиморфных коротких tandemных повторов - STR-маркеров (гипервариабельных последовательностей в геноме длиной 2-7 пар оснований), определенных для каждой хромосомы.*
- ✓ *Число аллелей может быть определено с использованием флуоресцентно меченых хромосом-специфичных праймеров для каждого из STR маркеров.*

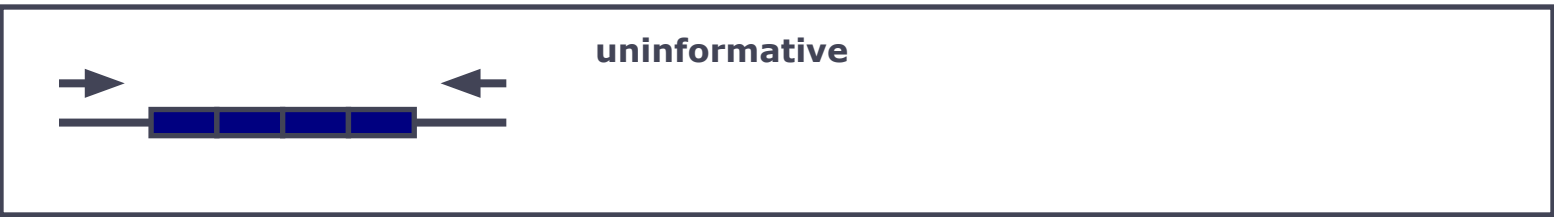
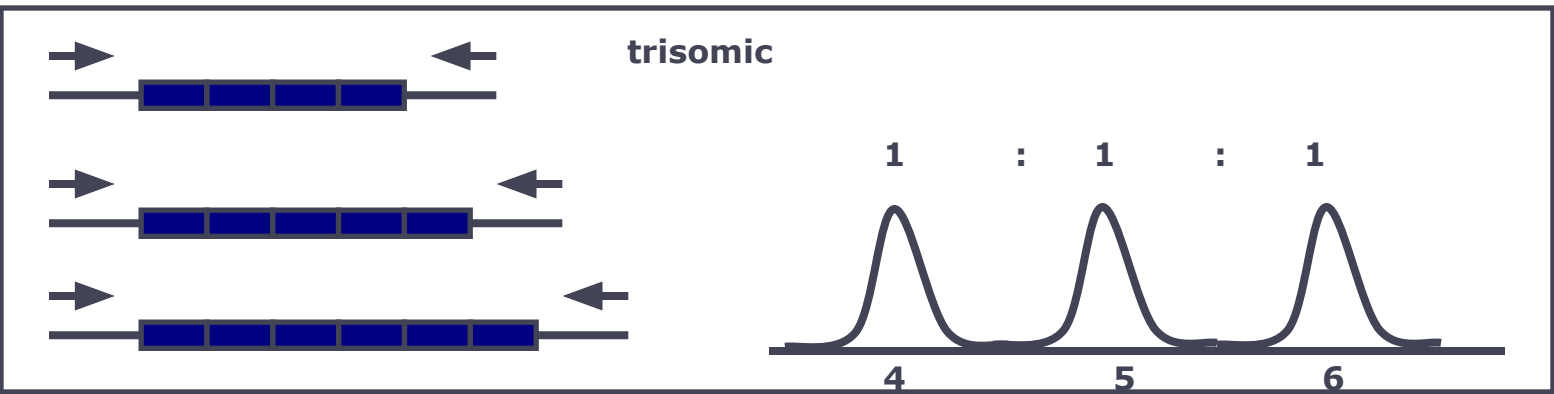
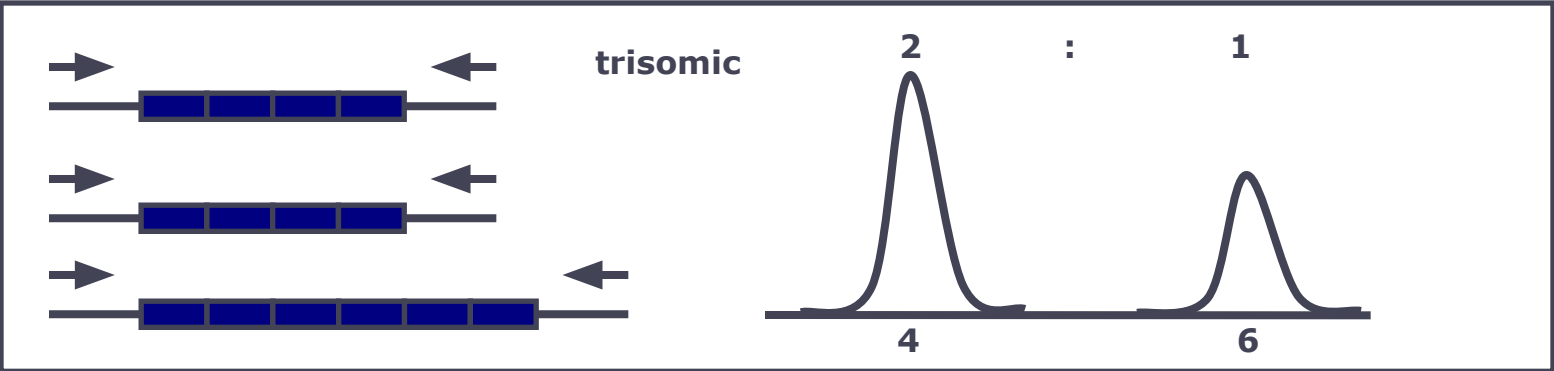
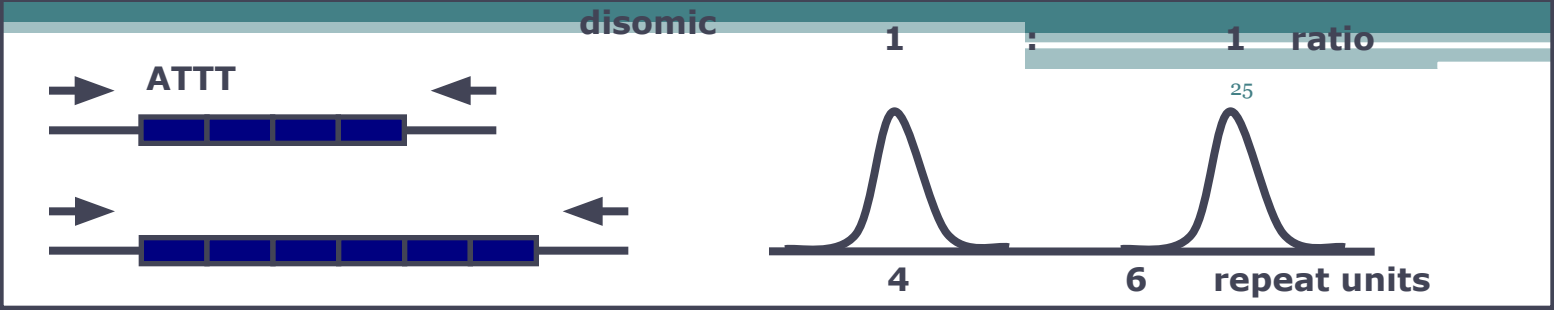




1 : 1 : 1

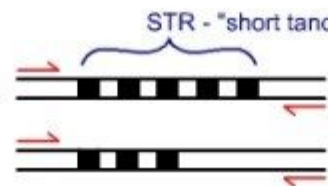


2 : 1



Принцип метода КФ - ПЦР

ПЦР

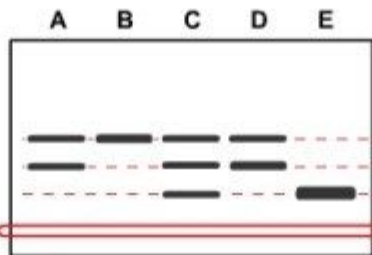


Материнская хромосома

Отцовская хромосома

индивидуумы

Гель электрофорез



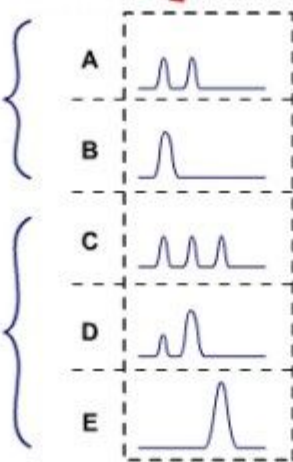
Аллель 1
Аллель 2
Аллель 3

КФ - ПЦР

индивидуумы

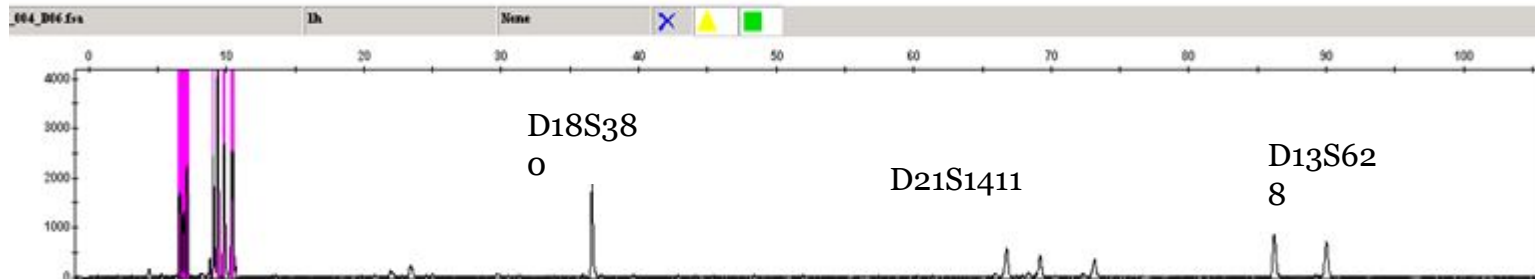
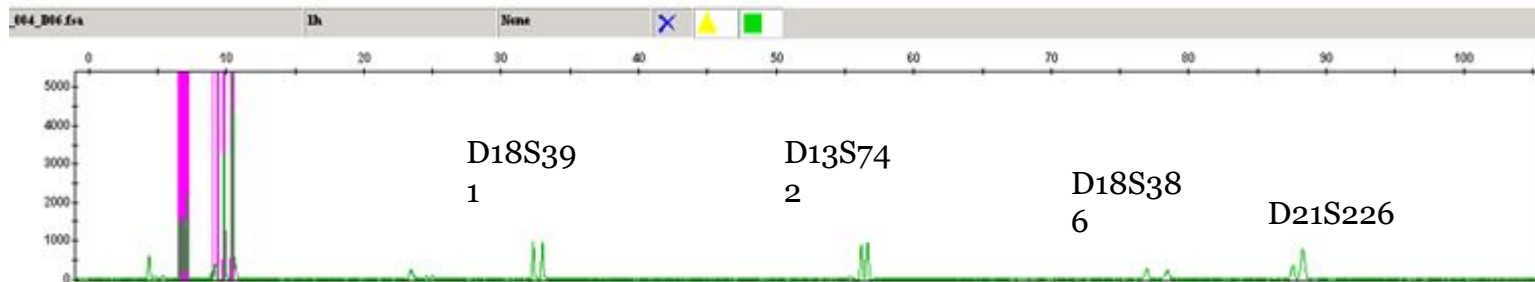
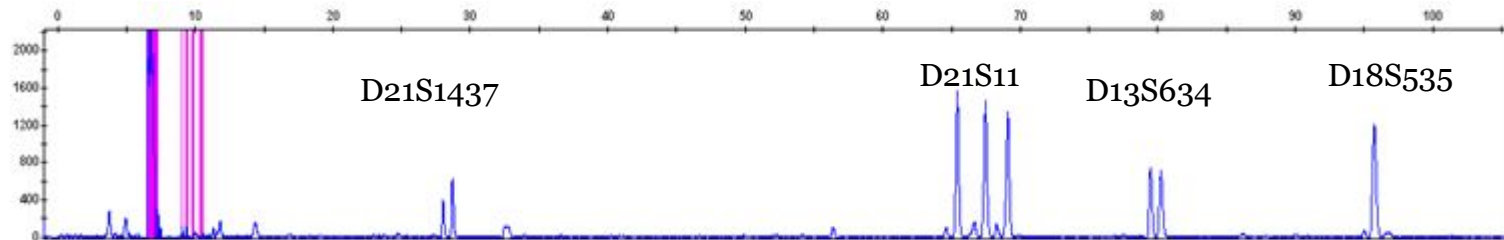
Норма

трисомия



Гетерозигота 1:1
Гомозигота (неинформативна)
Гетерозигота 1:1:1
Гетерозигота 1:2
Гомозигота (неинформативна)

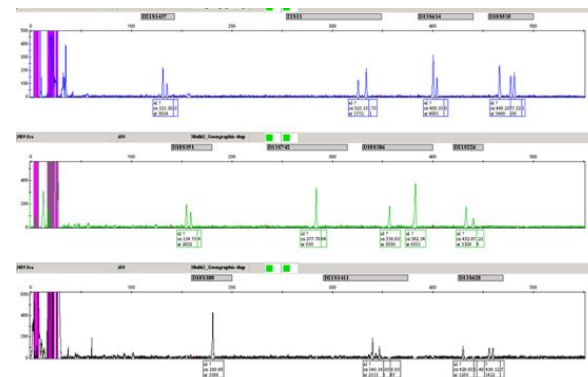
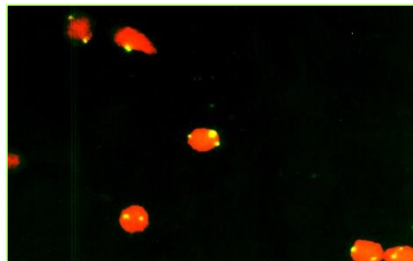
КФ-ПЦР детекция STR маркеров на хромосомах 13, 18, 21 у плода с трисомией 21 (синдромом Дауна)



Использование методов FISH и QF-PCR в целях пренатальной диагностики

преимущества

- возможность анализа некультивированных клеток
- скорость и производительность



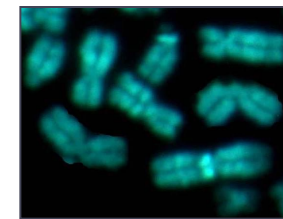
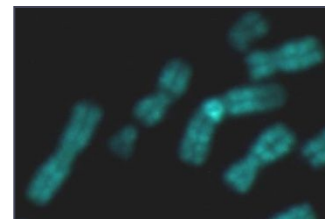
недостатки (объективные)

• **Селективный анализа индивидуальных хромосом.** На основании определения числа копий отдельных участков нескольких хромосом заключение о кариотипе (числе и структуре всего хромосомного набора) некорректно.

• Остаются проблемы анализа малоцентного мозаицизма.

• Не решается проблема структурных перестроек хромосом.

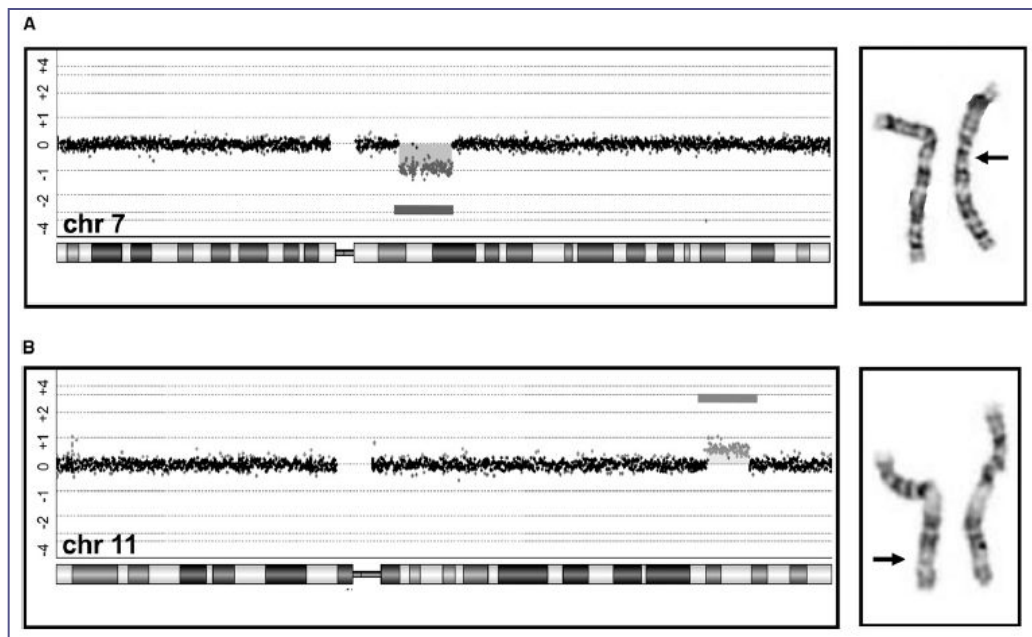
по результатам QF-PCR – 47,XXX



При кариотипировании лимфоцитов - 45,X/46,X,i(X)(q10)/47,X,i(X)(q10),i(X)(q10)

Сравнительная геномная гибридизация на микроматрицах (array-CGH)

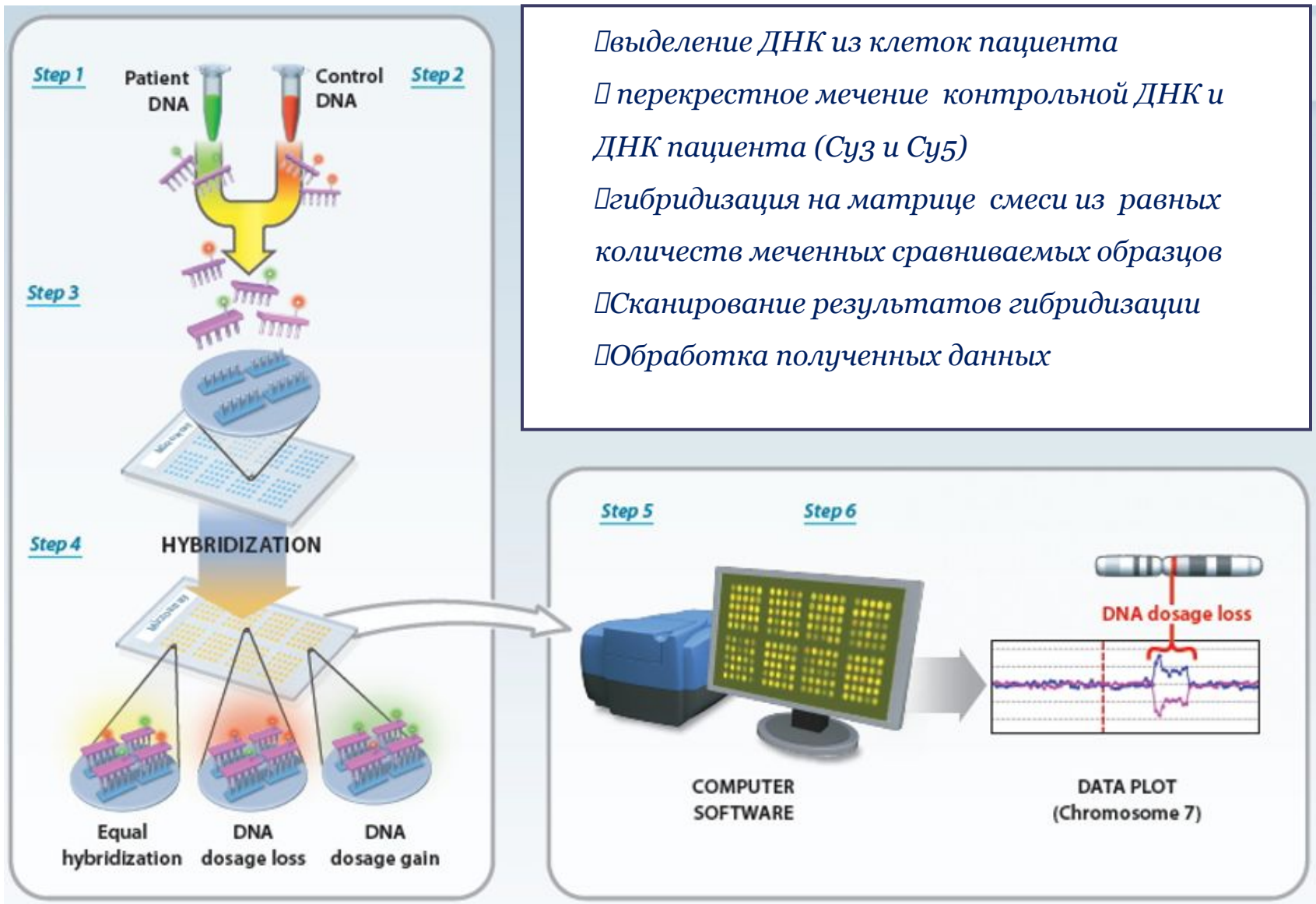
- ✓ Метод выявления несбалансированных структурных перестроек хромосом и анеуплоидий по целым хромосомам.
- ✓ Разрешающая способность метода позволяет идентифицировать микроделеции и микродупликации, невидимые при стандартном кариотипировании



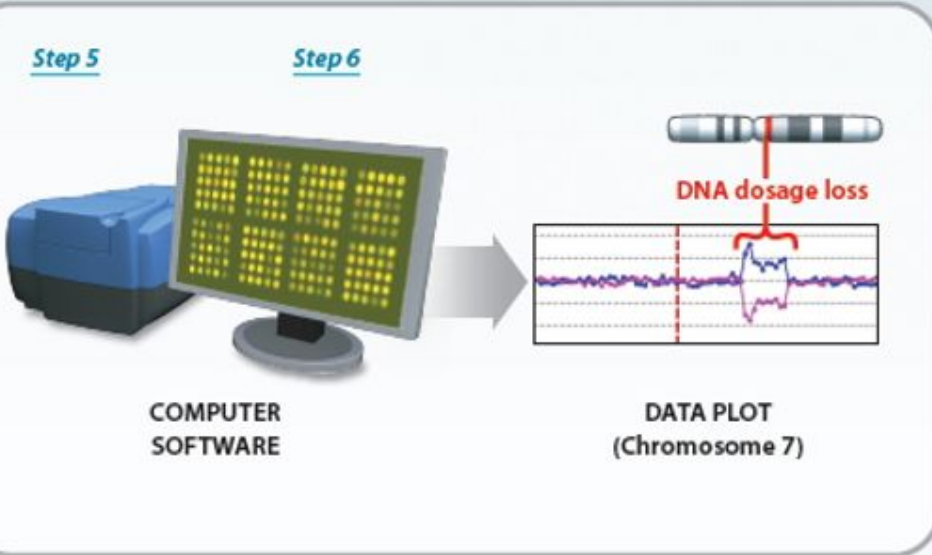
Показания:

- Идиопатическая задержка умственного и физического развития у ребенка
- МВПР у плода

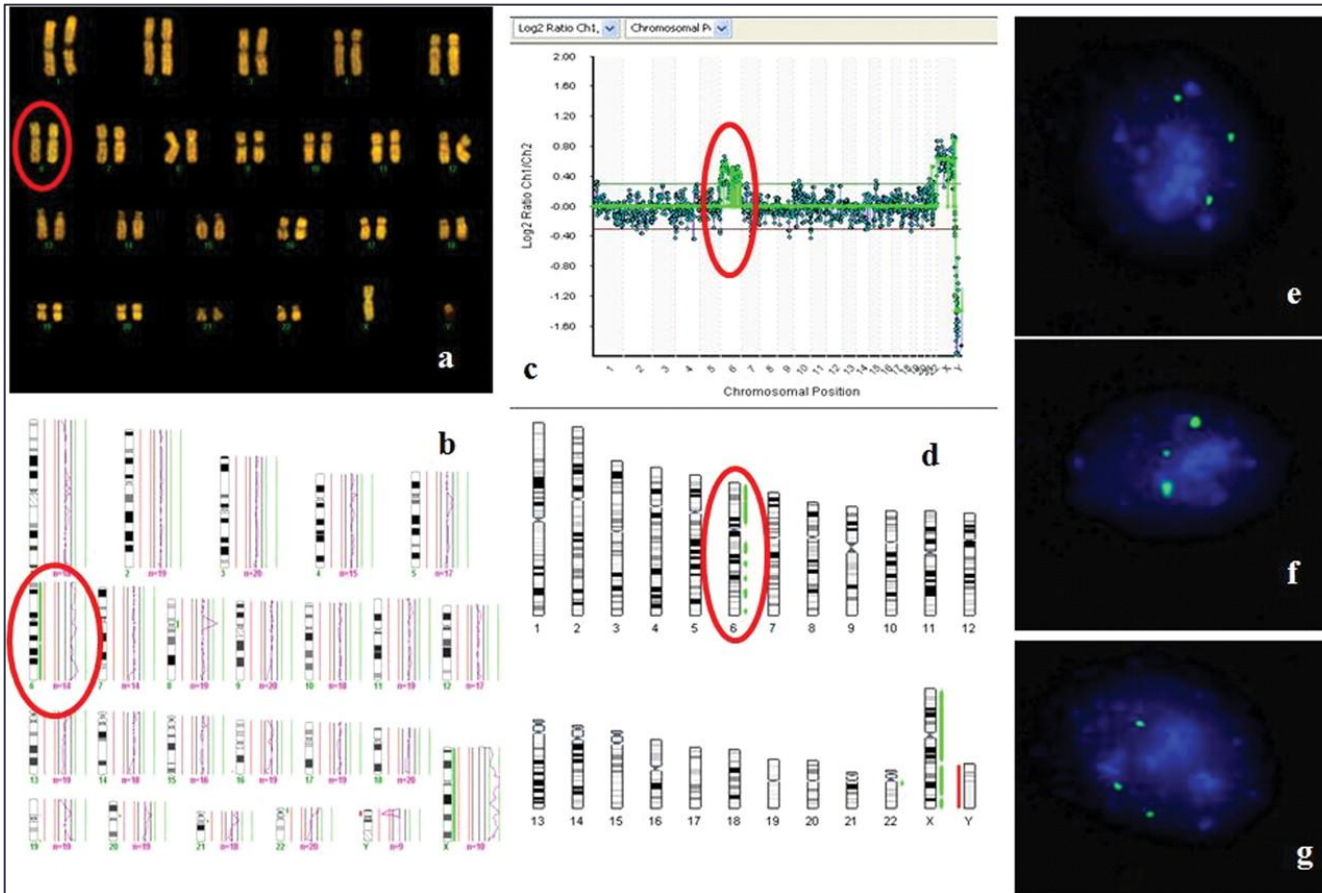
Сравнительная геномная гибридизация принцип метода



- выделение ДНК из клеток пациента
- перекрестное мечение контрольной ДНК и ДНК пациента (Cy3 и Cy5)
- гибридизация на матрице смеси из равных количеств меченных сравниваемых образцов
- сканирование результатов гибридизации
- обработка полученных данных



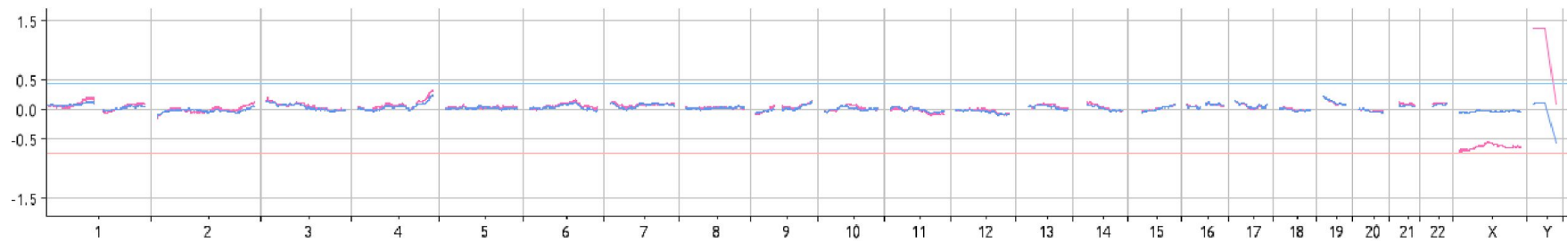
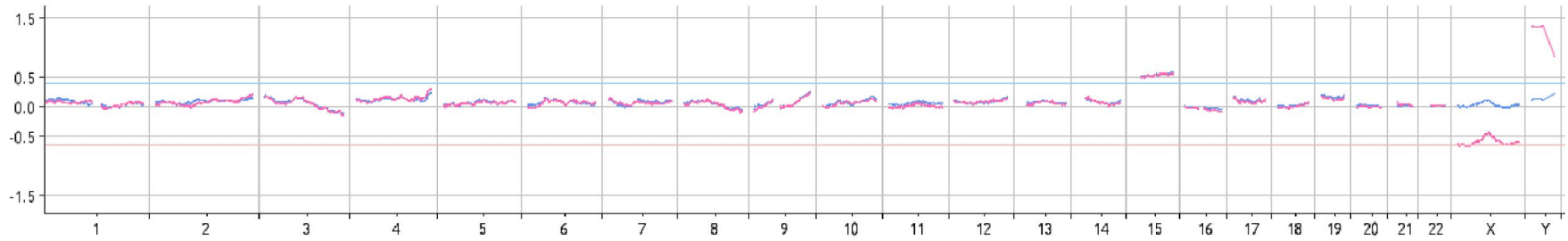
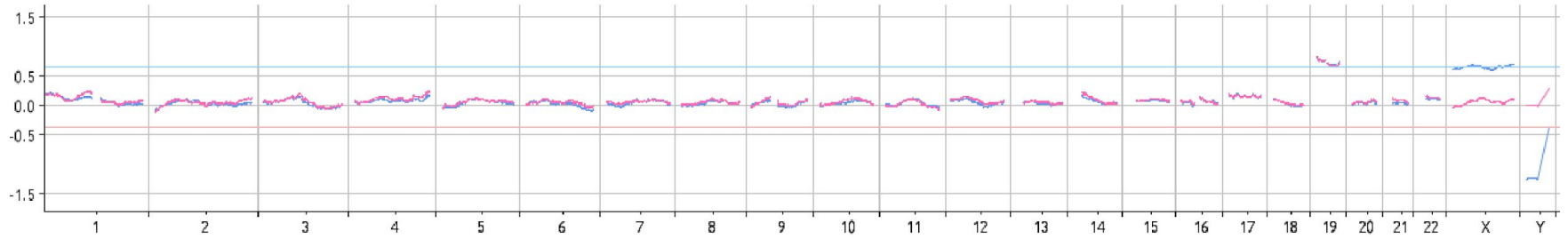
Сравнительная геномная гибридизация



Fragouli E et al. Hum. Reprod. 2011;26:480-490

Результаты сравнительной геномной гибридизации ДНК клеток бластоцисты (зеленое мечение) с референсной ДНК 46,XY (красное мечение). Результат верифицирован методом FISH

Сравнительная геномная гибридизация (ПГД)



С помощью сравнительной геномной гибридизации

Можно:

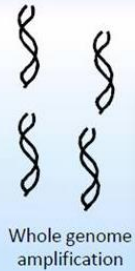
- исследовать аномалии кариотипа без цитологических препаратов, использовать клетки разных тканей
- в отличие от FISH и QF-PCR в одном эксперименте провести анализ числа всех хромосом и выявить несбалансированные микроперестройки по всему геному (в зависимости от плотности покрытия хромосом на матрице)

Нельзя:

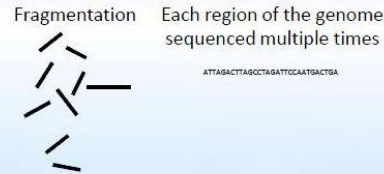
- выявить сбалансированные структурные перестройки!
- выявить низкоклональный мозаицизм (менее 10%)

Высокопроизводительное секвенирование

Next-generation sequencing (NGS)

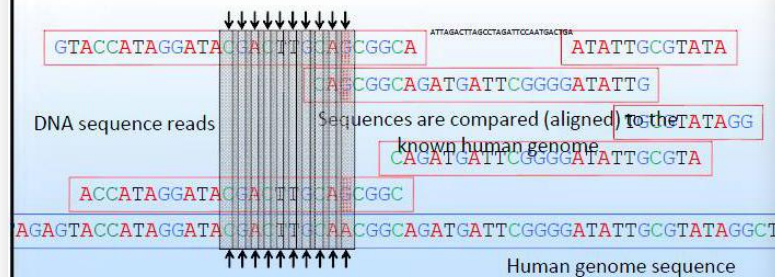


Next-generation sequencing (NGS)



Millions of short sequence 'reads' produced

Next-generation sequencing



The part of the genome from which each DNA fragment is derived is identified
Mutations detected and chromosome of origin is revealed

Next-generation sequencing (NGS)

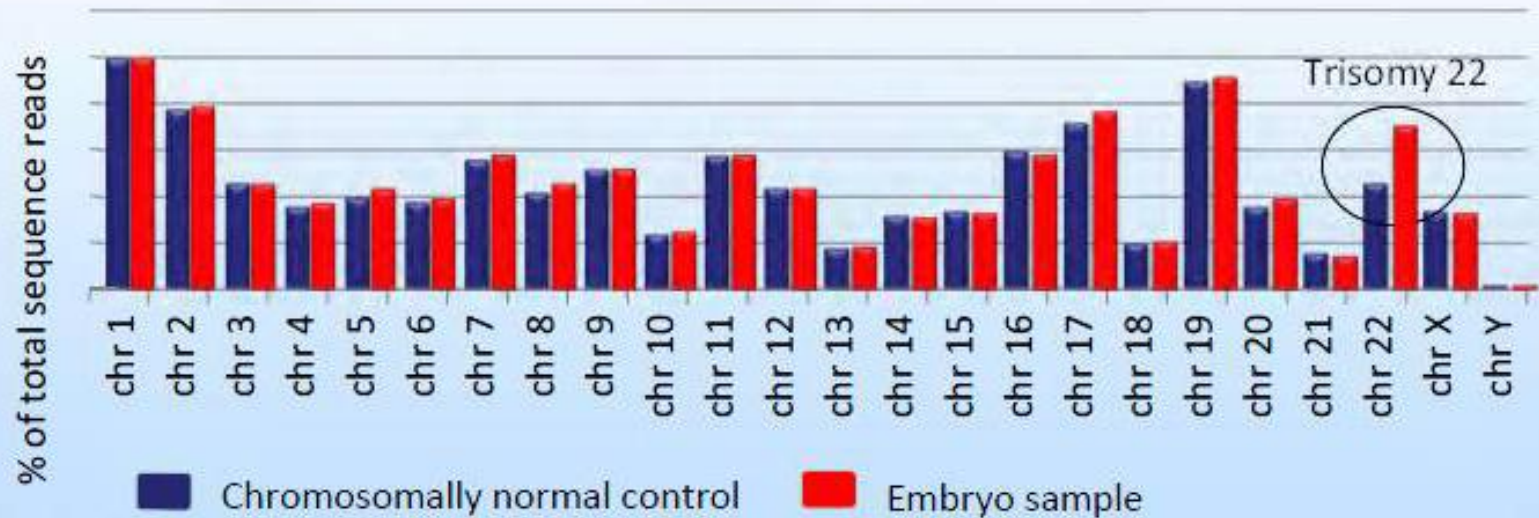
Sequences are aligned to the human genome



Only a tiny fraction of the genome is sequenced
Nonetheless thousands of DNA fragments are mapped to each chromosome

24-chromosome screening using NGS

Biopsy samples produce thousands of reads per chromosome



Методы анализа кариотипа

- ✓ Стандартное кариотипирование на метафазных хромосомах с помощью методов дифференциального окрашивания (геномные мутации, хромосомные мутации, выявляемые на уровне 300-850 блоков).
- ✓ Молекулярно-цитогенетические методы (FISH) – уточняющая диагностика структурных перестроек хромосом, анализ мозаицизма, выявление аномалий числа отдельных локусов хромосом и структурных перестроек хромосом в интерфазных ядрах клеток.
- ✓ Молекулярно-генетические методы (QF-PCR, array-CGH) – диагностика анеуплоидий по целым хромосомам и несбалансированных структурных перестроек хромосом без использования цитологических препаратов.