مقاله پژوهشی

به کار گیری هیبریدیزاسیون مقایسه ای میکرو آرایه ژنومی

محمد حسن کریمی نژاد[۱]، بیتا بزرگمهر[۱]، آریانا کریمی نژاد[۱]، کیمیا نجفی[۲]، کیا نجفی[۲]، آزاده مشتاق[۱]، رکسانا کریمی نژاد[۱*]

۱- مرکز پاتولوژی و ژنتیک کریمی نژاد-نجم آبادی
۲- دانشجوی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

میکرو آرایه کروموزومی در حال حاضر جایگزین کاریوتایپ به عنوان اولین تست تشخیصی در افراد دارای تاخیر تکاملی/ نارسایی ذهنی بدون توجیح، گستره اختلال اوتیسم یا ناهنجاریهای مادرزادی متعدد می باشد. ارزش تشخیصی آن برای تست ژنتیکی افراد فوق الذکر ۱۵٪ تا ۲۰٪ می باشد که در مقام مقایسه بسیار بالاتر از ۳٪ کاریو تایپ است (به غیر از سندروم داون و دیگر سندرومهای کروموزومی شناخته شده) در اینجا ما نتایج میکرو آرایه ۱۱۰ بیمار با اختلالات فوق الذکر را ارائه می نماییم.

از این ۱۱۰ مورد ۲۳ مورد(۲۰/۹٪) تغییرات تعداد در کپی را نشان داده اند که از آنها ۱۳ نفر دارای حذف ۵ نفر دارای دوپلیکاسیون و ۵ نفر دارای حذف و دوپلیکاسیون بودند. محدودیت میکرو آرایه برای یافتن ترانسلوکاسیون متعادل و موزائیسیزم سطح پایین می باشد. اما این اختلاف کروموزومی دلائل نادر فنوتیپ غیر عادی در این دسته از بیماران می باشد.

واژگان کلیدی: هیبریدزاسیون ژنومیک مقایسه ای؛ ناتوانی تکاملی؛ ناتوانی ذهنی؛ اختلال اوتیستیک؛ ناهنجاری مادرزادی.

در شماره پیشین فصلنامه ژنتیک در هزاره سوم گزارشی از تولد دانش سیتوژنتیک (۱) و سیر تکاملی آن؛ روش های نواری (۲)، پیدایش سیتوژنتیک مولکولی [۱](FISH) و آخرین دست آوردهای روز "مقایسه آرایه هیبریداسیون ژنوم انسانی" (aCGH) [۲] و گزارش نمونه هایی از توانمندی این روش گزارش شد (۳).

چون مبنای این روش، مقایسه ژنوم شخص مورد نظر با (DNA) کنترل طبیعی انسانی می باشد، یکی از امتیازات مهم و تفاوت این روش با روش های پیشین امکان بررسی کل ژنوم سلولهای زنده، مرده و نکروزه است (۶ و ۱) و یکی از محدودیت هایی که در آزمایشات قبلی لزوم سلول زنده، کشت، تقسیم و تکثیر آن وجود داشت در این فرآیند وجود ندارد (۶ و ۵)، قدرت تشخیص دقیق ناهنجاریهای ژنوم بسیار بالا و می تواند کمبود یا افزایش تعداد در کپی[۳] را درحد یک مگا باز بدقت مشخص نماید.

در استفاده از روش برتر قبلی FISH که در تشخیص ناهنجاریهای ریز کروموزومی به ویژه ریز حذفی ها[۴] مورد استفاده بوده و می باشد، برای هر مورد بیماری بایست نشانگر مخصوص آن ژن را تهیه و بطور اختصاصی FISH را برای ژن مورد نظر انجام داد. برای بیماریهای متفاوت که از نظر بالینی در تشخیص افتراقی مطرح می باشد، لازم

* رکسانا کریمی نژاد، دانشجوی PhD
رئیس بخش سیتوژنتیک، مرکز پاتولوژی و ژنتیک کریمی نژاد نجم آبادی
تهران، میدان صنعت، خیابان حسن سیف، کوچه چهارم، پلاک ۱۱۴۳
تلفن: ۰۲۱۸۸۰۷۹۷۲۳
پست الکترونیک: Roxana_kariminejad@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۷/۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۹/۷

1. Fluorescence In Situ Hybridization
2. array Comparative Genomic Hybridization
3. Copy Number
4. Microdeletion

Archive of SID
www.SID.ir

است برای هر یک از آنها نشانگر مخصوص تهیه و آزمایش را با نشانگر هر یک از همان بیماری های مورد نظر تکرار نمود.
در aCGH چون آزمایش بر روی کل ژنوم انسان انجام می گیرد و در حقیقت برای کل ژنوم نشانگر از پیش فراهم شده است نیازی به تکرار آزمایش و تهیه نشانگر برای هر ژن مخصوص ضرورت ندارد. در aCGH کل ژنوم انسان مورد بررسی قرار می گیرد و در مواردی می توان aCGH را برای قطعه خاصی از ژنوم تهیه و آزمایش نمود. aCGH با توانمندی قوی و بالایی که دارد می تواند به تنهایی به بسیاری از اشکالات سیتوژنتیک کلاسیک و مولکولی پاسخگو باشد و در بسیاری موارد نیازی به انجام آزمایش مکمل دیگر ندارد.
تنها اشکال این روش عدم توانایی در تمیز و تشخیص تغییرات متعادل کروموزومی مانند پلی پیلوئیدی (تریپلوئیدی، تتراپلوئیدی و ...) و جابجایی های متعادل (۶ و ۵ و ۱) می باشد که در این موارد بایستی از سیتوژنتیک کلاسیک و روش نواری G-band کمک گرفت.
با توجه به توانمندی بسیار دقیق و قوی aCGH کاربرد آن به سرعت جهانگیر شده و در بسیاری از مراکز علمی جانشین روش های قبلی گردیده است. به عنوان نمونه می توان به خلاصه مقاله ای که در شماره ۱۴ ماه مه ۲۰۱۰ مجله آمریکایی ژنتیک انسانی چاپ و منتشر شده است توجه نمود.
«کاربرد آزمایش aCGH در بررسی افرادی که مبتلا به تاخیر رشد جسمی و عقلی بدون دلیل (علت مشخص)، معلولیت ها و ارائه علائمی از گستره بیماری اتیسم [۵](ASD) یا ناهنجاری مادرزادی متعدد دارند در حال گسترش است. چون انجام CMA[۶] و G-band در هر بیمار هزینه آزمایش های ژنتیک را بالا می برد، کنسرسیوم بین المللی استاندارد آرایه سیتوژنومیک [۷] پس از برگزاری دو کارگاه عملی بین المللی و بررسی ۳۳ مطالعه مربوط به ۲۱۶۹۸ بیمار که برای آنها CMA و گاهاً همراه با G-band انجام شده بود، نتیجه بررسی بالینی سیتوژنتیک CMA و کاریوتایپ G-band را با در نظر گرفتن مزایای تکنیکی و محدودیت تشخیصی مربوط به ناهنجاری های مختلف کروموزوم که موجب اشکال تفسیر می شود، به شرح زیر منتشر نمود.
آزمایش CMA ۲۰- ۱۵٪ امتیاز تشخیصی بالاتری را نسبت به G-band برای تاخیر رشد (DD)[۸]، عقب افتادگی ذهنی (ID)[۹]، زمینه بیماری اتیسم (ASD)، ناهنجاری های متعدد مادرزادی (MCA)[۱۰] و به ویژه آزمایشات قبل از ازدواج که ریز حذفی ها اهمیت زیادی دارند. این برتری در سندرم داون و سایر اختلالات کروموزومی شناخته شده ٪ ۳- کمتر بود.
در حقیقت CMA نو ترکیبی های متعادل و موزائیسم با درجات کم را مشخص نمی نماید ولی بایستی توجه داشت که اینگونه ناهنجاری کمتر از یک درصد اشکال فنوتیپ را دربر می گیرد. شواهد زیادی نشان می دهد کاربرد CMA را بجای کاریوتایپ G-band می توان به عنوان اول قدم برای تعیین علت بیماری DD/ ID, ASD و MCA بکار گرفت.
آزمایش G-band بایستی محدود به مواردی باشد که بیماری به طور مشخص علائم ناهنجاری های کروموزومی را مانند سندرم داون، سابقه خانوادگی اختلال کروموزومی نو ترکیبی یا سابقه سقط مکرر نشان دهد».
با توجه به کارآیی قوی و دقیق روش aCGH به سرعت در تمام رشته های پزشکی منجلمه در تشخیص پیش از تولد (PND) جای خود را باز کرد (۱۰) و کاربرد زیادی بخود اختصاص داد (۱۰- ۷) با عنایت به توانمندی و کارآیی دقیق aCGH، نظر به اینکه تعداد قابل توجهی از موارد ارجاعی بدین مرکز مربوط به جنین های مرده زاد و ماحصل آبستنی های فاقد نسج زنده می باشد، ضرورت داشت امکان استفاده از این روش برتر روز را فراهم نماییم و تاکنون مجموعاً ۳۷۵ نمونه بشرح زیر مورد بررسی قرار گرفته است.

۱- محصول سقط ۲۰۸ مورد
۲- خون محیطی ۱۳۲ مورد
۳- سلولهای مایع آمنیون ۳۳ مورد
۴- پرزهای جفتی CV ۲ مورد

در این مقاله نتیجه بررسی ۱۳۱ مورد خون محیطی گزارش می شود.

نمونه مورد آزمایش و روش کار:

از ۱۳۱ نفر که جهت بررسی هیبریدیزاسیون مقایسه ای ژنومی مراجعه کردند ۱۰ سی سی خون هپارینه گرفته شد. استخراج DNA

5. . Autism Spectrum Disorder
6. . Chromosomal Microarray
7. . International Standard Cytogenomic Array
8. . Developmental Delay
9. . Intellectual Delay
10. . Multiple Congenital Anomalies

www.SID.ir
Archive of SID

جدول شماره ۱: نتایج آزمایش CGH ۲۳ بیمار مورد پژوهش

Sex	age	Clinical indication	Array results							
			Deletion				Duplication			
			Chr band	Size (Mb)	start nt	End nt	Chrom band	Size (Mb)	Start nt	End nt
F	9 yrs	ID/DD, add (13) in karyo.	13q33.2q34	8.9	106000000	11380000	2p25.2p25.2	2.7	142000	4260000
F	4 yrs	ID, trisomy 1q in karyo.					1q22.1q44	47	19870000	24683000
F	2 yrs	ID, 3 mar chrs in karyo.					1p12p12	1.3	118390000	119698000
							14q23.1q23.1	0.6	58060000	58678000
							18p11.21p11.21	2.4	12520000	14921000
F	4 mos	ID, del 4q in karyo.	4q21.23q23	14	85780000	100689900				
F	2 yrs	ID, del/ dup 4p in MLPA	4p16.3p16.3	0.173	995700	1169000	4p16.3p13	41	1689000	41433000
F	1 mo	ID, der(X) in karyo.	Xq21.33q28	41	11317748	154474202	2q31.2q37.3	62	179052000	241902000
F	5 yr	ID	3p21.3p21.2	2.5	8856000	113000000				
M	1 yr	DelY in karyo.	Yp11.2q11.2	1.8			Xp22.33p22.33	2.2		
			Yq11.22q11.23	10			Yp11.2p11.2	3.8		
							Yq11.21q11.21	1.4		
M	1 mo	MCA					X	whole		
M	5 yr	ID/MCA	15q11.2q13.1	4.6						
F	22 yr	45,X/46,X,r(X) in karyo.	Xp21.1q22.1	mos						
F	20 m	MCA					XpXq	whole		
M	2 yr	DD, del 7q in karyo.	7q35		144989000					
M	3 yr	DD	17q23.2	2.8	51460000	54210000				
F	3 yr	MCA	2q37.3	3.2	239050000	terminus	20p13q11.21	25.3	105720	25410000
F	17 yr	ID, 11q in karyo.	11q21q23.1	22	90989000	112667000				
F	5 mo	ID	17p11	3.7	16600000	20325000				
M	5 yr	ID	4p16.3p15.32	17	terminus	17468000				
M	7 yr	ID/MCA	10q11.21q11.22	3.8	45529000	49333000				
F	9 yr	ID	1p36.33p36.32	1.8	1664000	3465000				
F	5 yr	ID	10q26.3	1.1	132768000	133662000	10p15.2p11.21	35	3200000	38182000
F	1 yr	ID	3q13.2q21.2	17	113872000	128018000				
F	4 yr	ID/MCA					12p13.33p11.23	25		

Archive of SID

با استفاده از کیت‌های انجام شد. سپس کلیه نمونه ها با استفاده از proteinase K و ethanol precipitation پاکسازی شدند. جهت انجام هیبریدیزاسیون مقایسه ای ژنومی از هر نمونه ۴۰۰ نانوگرم DNA با استفاده از Bluegnome dCTP la-beling kit و مطابق با پروتوکل ارایه شده با رنگ Cy۳ و ۴۰۰ نانوگرم DNA کنترل با رنگ Cy۵ نشانگذاری شدند. دو نمونه با هم ترکیب شده و بر روی آرایه Cytochip به مدت ۱۲ تا ۱۶ ساعت هیبرید شدند.

پس شستشوی لامها مطابق با پروتوکل شرکت تولید کننده لامها با ۹۱۰ laser scanner innopsys اسکن و بایگانی شدند. کلیه تصاویر با نرم افزار Multifuse آنالیز شده و تمامی تغییرات با اعمال log۲ یافت شده مورد بررسی قرار گرفتند. تصمیم گیری در مورد ارزش بالینی تغییرات با توجه به استاندارد های ISCA و ACMG صورت گرفته و گزارش شدند.

در مواردیکه اختلال یافت شده قبلا تایید نشده بود با تکنیک دیگری از جمله FISH و یا MLPA تایید شدند.

نتیجه و بحث:

از ۱۳۱ مورد نمونه خون محیطی، ۱۱۰ مورد آن مربوط به بیماران و ۲۱ مورد آن مربوط به والدین فرزندانی است که آزمایش aCGH آنها اختلال ژنومیک نشان داده است، بیست و یک نمونه مربوط به والدین در هیچ یک از آزمایش ها: سیتوژنتیک، FISH و aCGH ناهنجاری نشان نداد. چنین استنباط می شود که در تمام بیماران این ناهنجاری به صورت ابتدایی بروز نمود ه است.

در بین ۱۱۰ مورد خون بیماران (۲۰/۹٪) ۲۳ نمونه ناهنجاری مختلف کروموزومی، ناهنجاری تعداد نشان می دهند که جزئیات آن در جدول شماره۱ دیده می شود:

ناهنجاری تعداد کپی در ۱۳ مورد بصورت کمبود، در پنج مورد افزایش و در پنج مورد دیگر شامل کمبود و افزایش می باشد جمعاً در ۱۶ نفر ماده (زن) و ۷ نفر نر (مرد) اختلال در تعداد کپی ژنومی دیده شد. با توجه بدین نکته در بین ۱۱۰ نفر بیمار، ۵۸ مورد مرد و ۵۲ نفر زن می باشند. با اینکه تعداد بیماران از نظر جنسیت تقریبا^2 متعادل می باشد ولی از نظر اختلال در تعداد کپی ژنومیک کاملا^2 متفاوت است. بدین معنا ۱۶ مورد از ۵۲ نفر زن (۳۱٪) ۱۶/۵۲ در برابر ۷ نفر از بین ۵۸ نفر (۱۲٪) ۷/۵۸ اختلال در تعداد کپی ژنومیک دارند. آیا این تفاوت ارتباطی به جنسیت دارد یا اتفاقی است؛ نیازمند بررسی آماری و تعداد بیماران بیشتری است. از نظر نوع ناهنجاری در بین ۱۴ مورد فقدان کپی ژنومیک، ده مورد آن در زنها و چهار مورد آن در جنس نر، از چهار مورد افزایش تعداد کپی ژنومیک، سه مورد آنها در جنس ماده و یک نفر جنس نر می باشد، چهار زن و یک مرد افزایش و کمبود را توامان با هم نشان می دهد.

References

1. TJio J, Levan A. The chromosome number of man. Hereditas 1956;42:1-6.
2. Lejeum J, Gautier M, and Turpin R.E. Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. Comptes rendus de Lacademie des sciences. Serie III: Sciences de la vie, Paris 1959; 248:1721-2.
3. Kariminejad R, Najafi K, Najafi K, Abassi M, Moshtagh A, Kariminejad MH. Application of array Comparative Genomic Hybridization in chromosomal aberrations. Genetics in the 3rd Millennium 2011;9(2):2351-2359
4. Oostlader AE, Meijer GA, Yi Stra B. Microarray based Comparative Genomic Hybridization and its application in human genetics. Clin Gent 2004; 66(6):488-95
5. Lockwood WW, Chari R, Chi B, Lam WL. Recent advances in array comparative genomic hybridization technology and their applications in human genetics. Euro J Hum Genet 2006;14:139-148
6. Hochstenbach R, Amstel HK, Poot M. Microarray, based genomic investigation: Molecular Karyotyping or Segmental aneuploidy profiling?. Eur J Hum. Genet 2006;14:262-265
7. Miller DT, Adam MP, Aradhya S. et al. Consensus statement: Chromosomal microarray is a firs-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. Am J Hum Genet 2010;86(5): 749-764, May.14.2010
8. 8- Blue cross and blue shelled, Executive summary special report: aCGH for the genetic evaluations with development delay/ mental retardation or autism Spectrum Dec. 2011
9. Jikas J, Vallee M, Castonguay L, Laframboise R, Maranda B, Piedboeuf B, Rousseau F. Clinical validity of karyotyping for the diagnosis of chromosomal imbalance following array comparative genomic hybridization. J Med Genet 2011 Dec;48(12):851-5. Epub 2011 Oct 1.
10. Peinning Li, Pawel Pomianowski, Miriam Setal. Genomic characterization of prenatally detected chromosomal structure abnormalities using Olygonucleotides array comparative genomic hybridization. AJMG Part A. 2011;155(7):1605-1615

Archive of SID

www.SID.ir