

Методы молекулярно-генетической диагностики сегодня

Никоненко Т.А.

Медицинская Компания ОМБ

За последние несколько лет успехи молекулярной биологии в медицине существенно преобразили спектр услуг лабораторной диагностики. Оказалось, что анализ отдельных генов, как и использование традиционных биохимических маркеров, позволяет диагностировать болезнь и мониторировать ее лечение. Обзор литературы посвящен описанию двух новых методов молекулярно-генетического анализа: цитогенетического анализа с использованием флуоресцентных красителей (FISH) и микрочипирования. Приведены сведения о диагностическом значении методов, возможности их применения в клинике, достоинствах методов и проблемах, связанных с их внедрением.

Для применения в диагностических лабораториях разработаны несколько методов молекулярно-генетического анализа: классический цитогенетический анализ (кариотипирование), ПЦР-диагностика (метод полимеразной цепной реакции), цитогенетический анализ с использованием флуоресцентных красителей (FISH), микрочипирование. Первые два метода – классический цитогенетический анализ и ПЦР-диагностика – уже нашли применение в некоторых российских диагностических лабораториях. Кариотипирование позволяет успешно проводить анализ анеуплоидии и трисомии, крупных транслокаций, инверсий и делеций хромосом. Метод ПЦР более востребован при анализе моногенных наследственных заболеваний, обусловленных точечными мутациями и делециями. Настоящий обзор посвящен описанию менее известным молекулярно-генетическим методам.

Диагностика с использованием метода Fluorescence in situ Hybridization (FISH).

Еще в 1969 г. Gall and Pardue [1] показали возможность изучения строения отдельных участков хромосом с помощью ДНК проб при гибридизации *in situ*. Сложности детекции проб на основе радиоактивной метки не позволяли вплоть до 1990 года использовать эту методику в цитогенетической практике. Разработка флуоресцентных меток для клонированных проб ДНК явилась основой молекулярно-цитогенетического метода, названного FISH-метод – Fluorescence in situ hybridization [2–4]. Метод позволяет объективно выявлять индивидуальные хромосомы и их отдельные участки на цитологических препаратах в метафазных или интерфазных ядрах на основе особенностей их молекулярно-генетического строения.

Подобно классическим методам в гистологии, цитологии и цитогенетике, FISH может проводиться на тканевых, клеточных и хромосомных препаратах. Однако объектом

исследования в данном случае являются не морфологические особенности ткани, клеток или хромосом, а особенности нуклеотидного состава конкретной хромосомы или ее отдельного участка. Соответственно, выявляемые изменения являются генетическими (этиологическими), а не морфологическими (фенотипическими), и относятся к более тонкому уровню организации наследственного материала клетки. FISH позволяет оценить генетический статус каждой отдельной клетки и выявить, к примеру, несколько этиопатогенетически значимых аномальных клеток среди тысяч клеток с нормальным генотипом, что не под силу ни одному методу (даже такому как ПЦР, при котором ДНК всех клеток смешивается и результат усредняется).

Метод FISH-анализа из исследовательского метода постепенно стал превращаться в необходимую аналитическую процедуру и востребован сегодня в пре- и постнатальной диагностике, в мониторинге зигот (бластомеров) при экстракорпоральном оплодотворении (ЭКО), в гематологической и онкологической практике, а также при мониторинге внешнесредовых воздействий на наследственный материал человека.

Классический метод FISH-анализа основан на гибридизации известной по нуклеотидному составу ДНК-пробы с участком тестируемой хромосомы и последующим выявлением результата гибридизации по метке – флуоресцентному сигналу в ожидаемом участке. В качестве ДНК-пробы (ДНК-зонда) могут служить относительно небольшие фрагменты ДНК, комплементарные анализируемой последовательности хромосомной ДНК (мишени) больного. Размер проб может варьировать от 90–100 тысяч до нескольких миллионов пар нуклеотидов, так что мишенью могут служить не только отдельные гены или хромосомные участки, но и целая хромосома. Наиболее часто применяемые меченые ДНК-пробы сегодня коммерчески доступны. В тех же случаях, когда в лаборатории имеется собственная коллекция хромосо-

или сайтспецифичных плазмидных, космидных или PAC-клонов, перед FISH необходимо приготовление нужной ДНК-пробы – мечение пробы путем ДНК-полимеразной реакции замещения (ник-трансляции).

FISH анализ осуществляется в несколько этапов:

- получение препаратов и их подготовка;
- мечение ДНК-пробы;
- гибридизация с ДНК-пробой, то есть собственно технология FISH:

- денатурация препаратов;
- денатурация ДНК-проб;
- процедура гибридизации;
- окраска препаратов;

- детекция ДНК-зонда при микроскопическом анализе.

По своей диагностической характеристике ДНК-пробы (зонды) подразделяются на несколько групп:

- CEP – Chromosome Enumerator Probe, хромосомные нумераторы или центромерные зонды;

- SubTel – Subtelomere specific, субтеломерные зонды;

- WCP – Whole-Chromosome-Painting, целно-хромосомные зонды;

- mBand – High Resolution Multicolor Banding, зонды для определения внутривитальных перестроек;

- LSI – Locus Specific Identifier, локус специфические зонды.

Центромерные пробы, и в меньшей степени, теломерные, широко используются в диагностике численных хромосомных нарушений (моносомии и трисомии). Наибольшее распространение эти пробы получили в пренатальной цитогенетической диагностике, особенно в исследованиях хориальной ткани, в ходе которых не всегда возможно получение качественных хромосомных препаратов или требуется быстрое цитогенетическое заключение при риске наличия распространенных хромосомных болезней, обусловленных нерасхождением хромосом. Остальные группы зондов востребованы для экспресс-диагностики с целью уточнения степени мозаицизма неделящихся клетках ворсин хориона и амниотической жидкости. По данным отечественных исследователей, чувствительность FISH-анализа (вероятность того, что плод с анеупloidией по хромосомам 13, 18, 21, X и Y будет позитивным по FISH-тесту) в среднем составляет 99,6%, а специфичность (вероятность того, что плод с нормальным набором хромосом 13, 18, 21, X и Y будет иметь нормальный FISH-тест) – 99,98%. При обследовании супружеских пар, страдающих бесплодием, показана эффективность центромерных зондов по X и Y хромосомам для выявления скрытого мозаицизма.

В последние годы центромерные зонды стали применяться для медико-генетических обследований родителей и будущего ребенка при проведении экстракорпорального

оплодотворения (ЭКО), при обязательном мониторинге развития зиготы в результате ЭКО, контроле качества спермы доноров, а также экспресс-диагностике причин ранних выкидышей и неразвивающихся беременностей. Метод FISH – чувствительный метод и для обнаружения цитогенетических отклонений уже на ранней стадии опухолевого преобразования клеток. Все большее распространение FISH зонды получают в диагностике и мониторинге лечения онкологических и онкогематологических заболеваний.

Достоинства метода:

- Метод допускает неинвазивный забор материала. Это существенно при анализе кариотипа плода: возможен забор лишь одной клетки blastomera перед имплантацией, или анализ редких фетальных клеток, циркулирующих в крови матери.

- Анализ занимает непродолжительное время – обычно 1–3 суток.

- Квалификация обслуживающего персонала может быть не столь высокой, как в случае с классическими методами, поскольку детекция аберраций упрощена.

- Меньшее количество ошибок по вине персонала из-за уменьшения объема рутинной работы.

- Возможен анализ кариотипа единственной клетки.

- Требования к чистоте исследуемого образца не столь высоки, как для метода ПЦР.

Проблемы внедрения метода:

- Монополия одной крупной фирмы производителя наборов на российском рынке не позволяет достаточно быстро и широко быстро внедрять технологию FISH.

- Недостаточно полно представлена линейка коммерчески доступных наборов.

- Малое число специалистов, подготовленных для работы с FISH.

- Еще не сложился единый стандарт в интерпретации полученных данных.

- Большую часть времени в FISH-диагностике занимает утомительный ручной процесс пробоподготовки.

Две последних проблемы из перечисленных вполне могут быть устранены внедрением автоматических систем FISH-диагностики, которые практически не представлены сейчас ни на российском, ни на мировом рынке.

Автоматические системы FISH-диагностики.

В методике FISH есть два принципиально различных этапа, которые могут быть автоматизированы: 1) этап получения изображения (пробоподготовка, мечение, гибридизация, окраска) – «front-end» системы; 2) этап анализа полученного

изображения -«back-end» системы. Этап пробоподготовки в российских лабораториях проводится, как правило, вручную. При увеличении потока FISH-анализов при ручной и полуавтоматической системе обработки данных пропорционально возрастает и количество ошибок по вине персонала. Это относится как к этапу подготовки проб, так и к этапу анализа изображения. Автоматическая система лишена таких недостатков. Кроме того, автоматизированный способ интерпретации результатов всегда одинаков и не варьирует в зависимости от оператора. Полуавтоматические системы анализа изображения FISH применяются в российских лабораториях почти повсеместно. Что же касается полностью автоматизированных систем, то сегодня на российском рынке представлена всего одна автоматическая «front-end» система для FISH и нет ни одной автоматической «back-end» системы.

Автоматизация диагностики FISH требуется там, где имеется постоянный поток однотипных анализов и есть определенные объемы работ, с которыми трудно справиться вручную. По данным специалистов ГНЦ РАМН, в нашей стране около 5 тысяч больных только хроническим миелолейкозом (ХМЛ). Это соматическое заболевание, для лечения и мониторинга которого нужно три плановых обследования каждого больного в год. В итоге получаем 15 тысяч анализов кариотипа только для лечения и мониторинга ХМЛ. В нашей стране такие цитогенетические исследования централизованы в нескольких крупных медицинских центрах. Таким образом, в этих клиниках набирается до 50–70 образцов для FISH-диагностики в день, что уже вполне достаточно для загрузки автоматических систем.

Диагностика с использованием биологических микрочипов.

Биологические микрочипы – это набор молекул ДНК (реже – белков), упорядоченно размещенных на специальном носителе, так называемой «платформе». Платформой может служить пластинка из стекла, пластика, кремния, или полимерная мембрана. Размер диагностической поверхности микрочипа может варьировать от нескольких квадратных миллиметров до 50 квадратных сантиметров. На каждом микрочипе может располагаться от 30–50 до нескольких десятков и даже сотен тысяч упорядоченно нанесенных микротестов или проб. ДНК-пробы длиной от 25–30 до 200–1000 нуклеотидов могут быть нанесены на кремниевую, стеклянную, нитроцеллюлозную подложку, выращены на кварцевой подложке методом имульсионной фотолитографии или внесены в гель (в случае гелевых чипов). Принцип действия микрочипов основан на способности комплементарных оснований

нуклеиновых кислот образовывать химические связи. Одна из комплементарных цепей ДНК (ДНК-проба), с известной последовательностью нуклеотидов, зафиксирована на «платформе» (подложке или пластине), а другая одноцепочечная ДНК-мишень (зонд), меченная флуоресцентной меткой, вносится в ДНК-чип. Наличие того или иного вещества или гена в образце определяют по люминесцентному свечению на прореагировавшем чипе. Анализ прореагировавших чипов производится автоматически с помощью специальной регистрирующей системы – анализатора (чип-детектора), который представляет собой либо флуоресцентный широкопольный микроскоп, либо специальное считывающее лазерное устройство, соединенные с видеокамерой и компьютером.

Аналитическая ячейка микрочипа – это:

- микроскопическое количество молекул зонда, прикрепленное к поверхности носителя или помещенное внутрь него (как в случае с гелевыми чипами),
- + флуоресцентно меченая ДНК зонда,
- + набор реактивов для мечения, гибридизации и детекции сигнала.

Собственно микрочиповый анализ включает в себя следующие этапы:

- Пробоподготовка анализируемого материала:
 - выделение и очистка анализируемой ДНК (или РНК) зонда;
 - амплификация ДНК (или РНК) зонда с одновременным мечением флуоресцентным красителем.
- Гибридизация амплифицированного, флуоресцентно меченого зонда с ДНК-пробами, содержащимися на микрочипе.
- Детекция сигнала.
- Обсчет полученных данных.

Технология микрочипов может быть использована в клинической диагностике для определения вирусов и микроорганизмов, гормонов, аллергенов, наркотиков, любых биоактивных веществ в любых малых концентрациях; в биологических и медико-биологических исследованиях; в криминалистике; для исследований в области экологии и биобезопасности.

Микрочипы можно классифицировать:

- По типу используемой платформы (стеклянная пластинка; пластиковая пластинка; кремниевая пластинка; нитроцеллюлозная мембрана; гелевая пластинка; кремниевые шарики).
- По количеству проб на одном чипе: от десятков и сотен проб – гелевые чипы и чипы на нитроцеллюлозных и нейлоновых мембранах, – до тысяч, десятков и сотен тысяч проб – чипы, «выращенные» на стекле и кремнии.

- По способу прикрепления зондов: нанесение на подложку уже готового зонда; выращивание молекул зонда на носителе (фотолитография); размещение молекул зонда внутри геля.

- По характеру наносимых на чип зондов: молекулы ДНК; белковые молекулы; молекулы ферментов.

- По способу детекции сигнала: детекция люминесценции с помощью микроскопа или лазерной сканирующей системы; измерение электропроводности гибридных молекул ДНК; измерение кривых плавления гибридных молекул ДНК.

Существуют два основных типа микрочипов – ДНК-чипы и белковые. Белковые чипы появились сравнительно недавно, с их помощью анализируют различные белковые молекулы – антитела, антигены, гормоны, аллергены. Сейчас основная доля производимых микрочипов – ДНК-чипы. Они способны анализировать так называемые линейные молекулы – ДНК и РНК – к примеру, находить мутации в генах, сравнивая «больные» и «здоровые» ДНК, или выявлять ДНК вирусов и бактерий.

Собственно микрочиповый анализ включает в себя следующие этапы:

- Пробоподготовка анализируемого материала:
 - выделение и очистка анализируемой ДНК (или РНК);
 - амплификация ДНК (или РНК) с одновременным мечением флуоресцентным красителем.
- Гибридизация амплифицированного материала с пробами, содержащимися на микрочипе.
- Детекция сигнала.

Применение микрочиповой технологии в диагностике патологий человека началось относительно недавно, сразу же после завершения проекта полного секвенирования генома человека. Первые микрочипы выращивались, подобно электронным чипам, на кремниевой подложке и включали в себя десятки тысяч олигонуклеотидных проб, покрывающих разнообразие чуть ли не всего генома. Применялись они исключительно в научно-исследовательских работах для выявления генов-мишеней, то есть групп генов, экспрессия которых изменялась при исследуемой патологии. Когда же, по мере накопления научных данных, такие группы генов обрели устойчивые очертания, компании-производители начали выпускать более специализированные продукты: наносить на микрочипы пробы только тех генов, которые, в большей или меньшей степени, вовлечены в специфический патологический процесс. Количество проб сократилось до тысяч, а затем и до сотен генов. Хотя тенденция заметно улучшилась, применение микрочипового анализа в клинике еще весьма ограничено. На Западе, как

правило, его применяют в крупных медицинских центрах кардиологического и онкологического профилей. В России же микрочипы как диагностический тест практически не представлены.

Достоинства метода:

- В одном образце может быть проанализирована экспрессия сразу большого количества диагностически значимых генов.
- Высокая воспроизводимость результатов. (Метод сводит ошибки по вине персонала к минимуму: все этапы проводятся на стандартных наборах; этапы детекции сигнала и обсчета результатов автоматизированы.)
- Анализ занимает непродолжительное время – от 4–6 часов до суток.
- Метод теоретически допускает неинвазивный забор материала и анализ кариотипа единичной клетки.
- Полученный на стадии амплификации материал может использоваться, теоретически, для ДНК-диагностики на протяжении всей жизни пациента.

Проблемы внедрения метода:

- Недостаточно полно представлена линейка коммерчески доступных наборов.
- Практически не представлена линейка диагностических микрочипов, сертифицированных для клинических исследований.
- Метод практически не известен среди российских специалистов.
- Малое число специалистов, подготовленных для работы с микрочипами.
- В отличие от FISH, метод микрочипов требует обязательной амплификации анализируемого материала.

Какие выводы можно сделать из всего вышеизложенного о перспективах развития спектра методов молекулярно-генетической диагностики?

Очевидно, что будущее за:

- увеличением разнообразия диагностических наборов;
- упрощением и автоматизацией процессов пробоподготовки;
- автоматизацией обсчета и анализа полученных данных.

По нашим прогнозам, описанные в данном обзоре методы начнут соответствовать этим требованиям не позже, чем через 3–5 лет*.

* Список литературы находится в редакции