کاربردهای فن دو رگه‌سازی ژنومی مقایسه‌ای آرایه در سرطان و بیماری‌های ژنتیکی: *مقاله مروری*

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۱۰/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۱۱/۲۱

محمد رضا نوری دلویی*
نازنین جلیلیان

گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی

دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

از زمان شناسایی تعداد دقیق کروموزوم‌های انسان در سال ۱۹۵۶ تاکنون فنون متفاوتی برای شناسایی اختلالات ساختاری و تعداد کروموزوم‌ها ایجاد شده‌اند. در این‌میان برخی‌از فنون مانند تهیهٔ کاریوتایپ و دو رگه‌سازی درجای فلئورسنت (FISH) افزون بر حضور در عرصهٔ پژوهش، در مطالعات بالینی نیز پرکاربرد ظاهر شده‌اند. یکی از عمده‌ترین محدودیت‌های این فنون قدرت تفکیک بوده است. به این ترتیب بسیاری از تغییرات ریز ژنومی قابل شناسایی نبوده و عامل محدود کننده بعدی عدم توانایی بررسی هم‌زمان تمام ژنوم بود. در سال ۱۹۹۷ سولیناس-تولدو روش جدیدی را معرفی کردند که می‌توانست بسیاری از کاستی‌های روش‌های پیشین را برطرف کند. این فن، دو رگه‌سازی ژنومی مقایسه‌ای (آرایه CGH)، قدرت تفکیک بالای FISH و توانایی مطالعه همه کروموزوم‌ها را همزمان به‌همراه دارد. آرایه CGH سرعت بالایی به‌پژوهش‌های ژنتیکی بخشیده است. به‌کمک این فن که پس از سال ۱۹۹۷ توسعه و تقویت نیز شد، پیشرفت‌های چشمگیری در دانش سرطان‌شناسی و همچنین در زمینه بیماری‌های ژنتیکی به‌دست آمده است. آرایه CGH این قابلیت را دارد که افزون بر کاربردهای پژوهشی، در زمینه تشخیص‌های بالینی نیز وارد گردد. این مقاله مروری با استفاده از ده‌ها منبع معتبر و به‌روز بر آن است تا همراه با معرفی فن آرایه CGH و مقایسه آن با روش‌های سیتوژنتیک مولکولی، به‌برخی کاربردهای آن در سرطان‌شناسی و بیماری‌های ژنتیکی بپردازد.

کلمات کلیدی: دو رگه‌سازی ژنومی مقایسه‌ای، دو رگه‌سازی درجای فلئورسنت، سرطان، بیماری‌های ژنتیکی.

*نویسنده مسئول: تهران، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران تلفن: ۸۸۹۵۳۰۰۵
email: nooridaloii@sina.tums.ac.ir

مقدمه

پس از آن‌که Levan در سال ۱۹۵۶ عدد درست کروموزوم‌های انسان را گزارش کرد،[۱و۲] انجام مطالعات بعدی روی کروموزوم‌ها و ابداع روش‌های دقیق‌تر، انحرافاتی را از وضعیت طبیعی نشان می‌داد. این انحرافات به‌صورت عددی و ساختاری در کروموزوم‌ها مشخص می‌شوند. تغییرات عددی شامل به‌دست آوردن یا حذف یک یا چند کروموزوم (تغییرات آنیوپلوییدی)، یا کسب یک دست (Set) کامل کروموزومی (پلی پلوییدی) است. دستهٔ دوم تغییرات، در ساختار کروموزوم ایجاد می‌شود و شامل مواردی مانند جابه‌جایی‌ها، حذف‌ها و دوتا شدگی‌ها می‌باشد.[۲و۳] هریک از این اختلالات می‌تواند پیامد-های فنوتیپی متفاوتی را در پی داشته باشد، این مسئله لزوم وجود فنون قدرتمند برای شناسایی اختلالات کروموزومی را نشان می‌دهد. نخستین فنی که امکان بررسی تغییرات کروموزوم‌ها را فراهم کرد، تهیهٔ کاریوتایپ بود. این روش در دهه ۱۹۵۰ معرفی شد. به کمک کاریوتایپ بسیاری از ناهنجاری‌های تعدادی و همچنین ارتباط تغییرات تعداد کروموزوم‌ها با برخی بیماری‌ها شناسایی شدند.[۴] پس از آن با ابداع روش‌های نواربندی، ابزارهای علم سیتوژنتیک نیرومندتر شد.[۵] به‌کمک روش نواربندی افزون بر تغییرات تعدادی، بسیاری از تغییرات ساختاری کروموزوم‌ها مشخص می‌شود. به این ترتیب نواربندی به یکی از ابزارهای قدرتمند برای تشخیص مبدل شد، و امروزه در بسیاری از آزمایشگاه‌های سیتوژنتیک از آن استفاده می‌شود. این فن نقاط ضعف عمده‌ای مشتمل بر موارد زیر داشت: نیاز به سلول‌های تقسیم شونده و قدرت تفکیک پایین.[۶و۷] قدرت تفکیک روش‌های نواربندی معمولی حدود ۴۵۰ نوار در هر دست هاپلویید است.[۲] با این روش بسیاری از تغییرات کوچک‌تر ساختار کروموزوم غیر قابل شناسایی است. بنابراین روش‌های سیتوژنتیک گوناگونی با قدرت تفکیک بالاتر ایجاد شدند. از جمله این‌روش‌ها تهیهٔ کاریوتایپ و نواربندی با قدرت تفکیک بالا است. نواربندی با قدرت تفکیک بالا

از کروموزوم‌های مراحل اولیه میتوزی (پروفاز یا پیش متافاز) تهیه شود و تا ۸۰۰ نوار در هر دست (set) هاپلویید ایجاد می‌کند.[۸]

تولد سیتوژنتیک مولکولی: فن دو رگه‌سازی فلئورسنت درجا Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) در ۱۹۸۰ معرفی شد.[۹] ابداع روش FISH، آغازی برای سیتوژنتیک مولکولی است. با ابداع FISH فاصله سیتوژنتیک و ژنتیک مولکولی به‌مراتب کوتاه‌ترشد. FISH به‌زودی توانست به مثابه ابزاری پرکاربرد و مطمئن وارد آزمایشگاه‌های تشخیصی شود. در این فن برای نواحی ویژه‌ای از DNA، کاوشگر (Probe) تهیه می‌شود. هر کاوشگر در واقع قطعه‌ای از DNAی ژنومی است که با مواد فلئورسنت نشان‌دار شده و مکمل توالی‌های ویژه‌ای از DNA است. بدین‌ترتیب، وجود یا عدم وجود سیگنال فلئورسنت و مقدار و شدت آن، ناهنجاری عددی یا ساختاری کروموزومی را مشخص می‌کند. افزون بر کروموزوم‌های متافازی، از روش FISH می‌توان برای مطالعه کروموزوم‌های اینترفازی نیز استفاده کرد.[۱۱و۱۰و۲] بسته به‌هدف بررسی، برای بخش‌های گوناگون کروموزوم پروب‌های متنوعی طراحی می‌شود. پروب‌ها معمولاً اختصاصی برای نواحی ویژه‌ای از کروموزوم هستند. دسته‌ای از آن‌ها، پروب‌های سانترومری است که از روی توالی‌های تکراری سانترومر طراحی می‌شوند و به‌ویژه در تشخیص تغییرات آنیوپلوییدی کاربرد دارند. کاستی این دسته از پروب‌ها ناتوانی در فراهم کردن اطلاعات از سایر نواحی کروموزوم و ناهنجاری‌های کروموزومی ناحیه یوکروماتین است. بر اساس توالی‌های ناحیه تلومر نیز پروب طراحی می‌شود. پروب‌های تلومری به‌ویژه در بررسی ناهنجاری‌های ریز تلومری کاربرد دارند. پژوهش‌ها نشان می‌دهد که دلیل بسیاری از عقب ماندگی‌های ذهنی، حذف‌های ریز ناحیه تلومر است.[۱۲] پژوهشگران توانسته‌اند مجموعه کامل پروب‌های تلومری را ایجاد کنند. Henegariu با استفاده از دو رگه‌سازی چند رنگ با پروب‌های مخصوص ناحیه انتهایی کروموزوم (۱Mb-۱٪ از انتهای تلومر) به‌طور هم‌زمان انتهای ۴۱ کروموزوم انسان را مطالعه کرد.[۱۳] دسته سوم پروب‌ها بر اساس ناهنجاری‌های کروموزومی شناخته شده طراحی می‌شوند. بسیاری از نشانگان‌هایی که در اثر حذف‌های ریز کروموزومی ایجاد می‌شوند به‌این ترتیب قابل شناسایی‌اند. هم‌چنین می‌توان برای سرتاسر طول یک کروموزوم نیز پروب طراحی کرد، به‌این ترتیب امکان بررسی گسترده تمام طول یک کروموزوم از لحاظ ناهنجاری‌های ساختاری میسر می‌شود.[۱۴] با ابداع FISH، بسیاری از ناهنجاری‌های کروموزومی که تا پیش از این توسط سایر روش‌ها، قابل تشخیص نبود، شناسایی شدند. البته با وجود مزایای متعدد، فن FISH مرسوم معایبی نیز دارد؛ از جمله این‌که باید محل و توالی دقیق ناحیهٔ مورد بررسی مشخص باشد، به این ترتیب از FISH نمی‌توان برای شناسایی ناهنجاری‌های ناشناخته استفاده کرد. هم‌چنین در هر نوبت تنها می‌توان از تعداد محدودی کاوشگر استفاده کرد و برای بررسی هم‌زمان کل ژنوم قابل استفاده نیست.[۱۵]

دو رگه‌سازی ژنومی مقایسه‌ای: در سال ۱۹۹۲ فن دیگری برای بررسی تغییرات تعدادی توالی‌های کروموزومی و ژن‌ها (حذف شدگی‌ها و دوتا شدگی‌ها) معرفی شد که می‌توانست همهٔ کروموزوم‌ها را به‌طور هم‌زمان در یک آزمایش بررسی کند و نیازی به سلول‌های تقسیم شونده نداشت. دو رگه‌سازی ژنومی مقایسه‌ای (Comparative Genomic Hybridization) توسط Kallioniemi معرفی شد. در این فن نمونهٔ DNAی ژنومی فرد بیمار (آزمون) و همچنین نمونهٔ DNAی فرد سالم (مرجع) با رنگ‌های سبز و قرمز نشان‌دار می‌شود. این نمونه‌ها در مرحله بعد با DNAی متافازی فرد طبیعی دو رگه‌سازی (Hybrid) می‌شوند و نسبت سیگنال‌های دو رگه‌سازی آزمون و مرجع به شکل دیجیتال توسط دستگاه در طول هر کروموزوم محاسبه می‌شود. در نواحی کروموزومی که در هر دو نمونه به‌میزان یکسان (نسبت ۱) وجود دارد، هر دو رنگ سبز و قرمز شده که ترکیب آن به رنگ زرد مشاهده می‌شود. نواحی حذف شده با نسبت کم‌تر از یک و به رنگ قرمز و نواحی دوتا شده در فرد آزمون به رنگ سبز (نسبت بالای ۱) مشاهده خواهد شد.[۱۶]

کاربردهای دو رگه‌سازی ژنومی مقایسه‌ای در پزشکی: با توجه به توانایی CGH در بررسی همزمان همه کروموزوم‌ها و عدم نیاز به سلول تقسیم شونده، این فن به یکی از رایج‌ترین روش‌های بررسی ژنوم تبدیل شده است. از CGH می‌توان برای شناسایی نواحی کروموزومی که دچار حذف یا دوتا شدگی شده‌اند استفاده کرد. فن CGH توانسته است پیشرفت‌های چشمگیری را در زمینه ژنتیک سرطان؛ پیش‌آگهی، درمان، متاستاز و نیز سبب‌شناسی ناهنجاری‌هایی با دلیل ظاهراً نامعلوم حاصل کند.[۳] در این بخش با اختصار برخی از کاربردهای CGH در سرطان‌شناسی را بررسی می‌کنیم.

سرطان و متاستاز: متاستاز واژه‌ای یونانی و به معنای تغییر مکان

(displacement) است و در سرطان‌شناسی، مرحله‌ای است که در آن برخی از سلول‌های توموری (تومور اولیه) از بافت (مکان اولیه خود) جدا می‌شوند و از راه خون یا سیستم لنفاوی در بافت دیگری وارد شده و تومور جدیدی (تومور ثانویه) را ایجاد می‌کنند. متاستاز، که یکی از نشانه‌های عمده بدخیمی است، فرایندی پیچیده است و عوامل متعددی در ایجاد آن نقش دارند، ناهنجاری‌های ژنومی سلول‌های توموری یکی از عمده‌ترین دلایل است.[۱۷و۷و۲] شناسایی این تغییرات و ژن‌های درگیر گام بلندی در تعیین سازوکار بیماری‌زایی و درمان سرطان است. فن CGH می‌تواند این نواحی کروموزومی را که در سلول‌های توموری دچار حذف‌شدگی یا اضافه‌شدگی گردیده‌اند شناسایی کند. به این ترتیب دو رگه‌سازی ژنومی مقایسه می‌تواند نقش چشمگیری در زمینه سرطان‌شناسی داشته باشد.[۲۰-۱۸] Rydzanicz به‌کمک فن CGH موفق شد الگوی تغییر تعداد رونوشت‌های DNA در تومورهای متاستازی ریه را محاسبه کند. سرطان ریه یکی از رایج‌ترین بدخیمی‌ها است که اغلب موجب مرگ مبتلایان می‌شود. متاستاز به گره‌های لنفاوی دلیل عمده شکست روش‌های درمانی است. با وجود مطالعات گسترده، هنوز سازوکارهای مولکولی دقیق ایجاد و پیشرفت سرطان ریه مشخص نشده است. در این آزمایش ۴۲ کارسینوم سلول سنگفرشی Squamous Cell Carcinoma (SCC) ریه انتخاب شده و مطالعه مستقیمی بر روی تغییر در تعداد نسخه‌ها در تومورهای متاستازی و غیرمتاستازی انجام گرفت. نتایج این بررسی‌ها نشان داد شماری تغییرات ژنتیکی از جمله حذف 11q-16p-16q-19p و اضافه شدن در 4q-7q-12p-13q-18p بیشتر در تومورهای متاستازی مشاهده می‌شود و اضافه شدن در 7q(7q31.2-q32) به‌طور مستقیم با درگیر شدن گره‌های لنفاوی ارتباط دارد.[۲۱و۱۸] به این ترتیب فنونی مانند CGH سرنخ‌های اصلی و اولیه را در شناسایی بیماری‌زایی فراهم می‌کنند. در مراحل بعدی پژوهش می‌توان ژن‌های موجود در این توالی‌ها را شناسایی کرده و مطالعات تکمیلی را بر اساس این ژن‌ها طراحی کرد. برای نمونه در بررسی بالا، ناحیه 7q مربوط به دو ژن سرکوب‌گر تومور یعنی WNT2 و c-Met است. افزایش در بیان این دو ژن می‌تواند در القای حالت تهاجمی تومور و متاستاز کارسینوم سلول‌های سنگفرشی ریه نقش داشته باشد.[۱۸] گفتنی است بر اساس آمار سال ۲۰۰۲، سرطان معده چهارمین سرطان رایج در سرتاسر جهان است و از لحاظ نرخ مرگ و میر، با نرخ ۷۰۰,۰۰۰ مرگ در سال، پس از سرطان ریه در رتبه دوم قرار دارد.[۲۲] هم‌چنین بر اساس آمار منتشر شده در سال ۲۰۰۷ توسط جامعه سرطان آمریکا سرطان معده دومین سرطان رایج در مردان جهان است و در خصوص زنان در رتبه پنجم قرار دارد.[۲۳] در سرطان معده نیز مشکل متاستاز به گره‌های لنفاوی وجود دارد. در واقع در ۸۰ تا ۹۰ درصد موارد سرطان معده متاستاز رخ می‌دهد. چنان‌چه پیش‌تر اشاره شد، متاستاز از عوامل عمدهٔ بدخیم شدن و شکست درمان است. به‌دلیل اهمیت این موضوع، مطالعه Liu برای یافتن ژن‌های درگیر در متاستاز سرطان معده انجام گرفت. در این آزمون تومورهای اولیه و تومورهای متاستاز یافته از آن (تومور ثانویه) در ۲۰ بیمار برای یافتن تفاوت در تکرارها به‌کمک CGH بررسی شد. نتایج حاصل از CGH نشان می‌دهد تغییراتی مانند کسب در 5p، 7، 8q، 13q، x و نیز حذف در 1p، 17p، 19، 21q و 22q در هر دو نوع تومور (اولیه و متاستازی) مشاهده می‌شود و کسب در توالی ۱۳-20q12 و حذف در 21qcen-21,4q,14q22-ter تنها در تومورهای متاستازی وجود دارد. به این ترتیب می‌توان نتیجه‌گیری کرد که این تغییرات احتمالاً در متاستاز به گره لنفاوی نقش دارد.[۲۴] مرحله بعدی این پژوهش می‌تواند یافتن ژن‌های موجود در این توالی‌ها باشد.

محدویت‌های فن CGH: با وجود کاربردهای فراوان، فن CGH دارای محدودیت‌های عمده‌ای نیز هست. دو رگه‌سازی ژنومی مقایسه‌ای قادر به شناسایی موزاییسم، جابه‌جایی‌های کروموزومی متعادل، واژگونی‌ها و تغییرات پلوییدی کل ژنوم نیست.[۲۵] هم‌چنین توالی‌های تکرار کوتاه DNA که در افراد متفاوت تنوع بالایی نشان می‌دهند، در بررسی‌های CGH اختلال ایجاد می‌کنند. به‌منظور جلوگیری از کارکرد توالی‌های تکراری DNA از جمله سانترومر و تلومر، می‌توان این توالی‌ها را با Cot1DNA، که یک DNAی تکراری غیر نشان‌دار است، مهار کرد یا آن‌ها را از مطالعه حذف نمود.[۳] محدودیت عمدهٔ دیگر فن CGH، قدرت تفکیک آن است. تغییرات کروموزومی کم‌تر از 5-10Mb توسط CGH قابل شناسایی نیستند.[۲۶] روش FISH برای شناسایی تغییرات کوچک‌تر قابل استفاده است؛ اما چنان‌چه پیش‌تر اشاره شد برای مطالعه با FISH دانستن توالی اولیه ناحیه هدف الزامی است. فن دیگری که با توجه به نیاز برای شناسایی تغییرات کروموزومی کوچک‌تر طراحی شده است، دو رگه‌سازی ژنومی مقایسه‌ای ریز آرایه (Array Comparative Genomic Hybridization) یا به اختصار

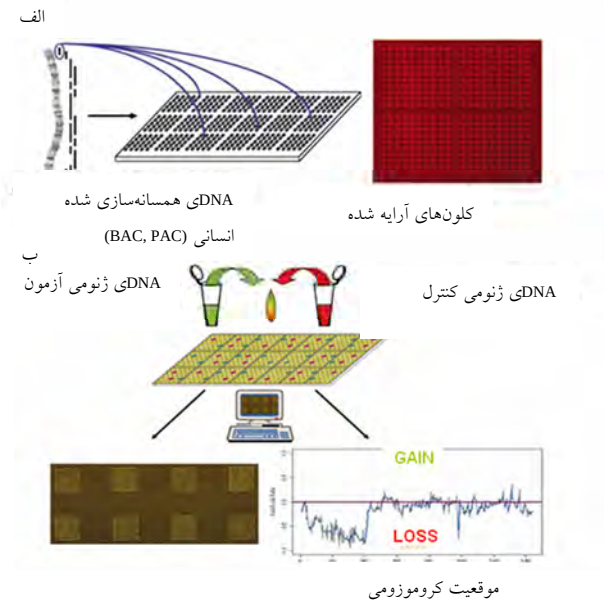
آرایه CGH است. این نوع آرایه قدرت تفکیک بالای FISH و توانایی مطالعه هم‌زمان همه کروموزوم‌ها را به‌همراه دارد. این ویژگی‌ها قابلیت بالایی به این فن داده است، در ادامهٔ مطالب نکات بیش‌تری پیرامون آرایه CGH، قابلیت‌ها و کاربردهای آن ارائه شده است.

دو رگه‌سازی ژنومی مقایسه‌ای ریز آرایه: فن آرایه CGH نخستین بار در سال ۱۹۹۷ توسط Solinas-Toldo معرفی شد. چنانچه پیش از این اشاره شد در روش CGH برای دو رگه‌سازی از کروموزوم‌های متافازی به‌عنوان DNAی هدف استفاده می‌شود؛ این پژوهشگران برای بهبود قدرت تفکیک CGH، روش جدیدی طراحی کردند که در آن دورگه‌سازی به‌جای DNAی متافازی با توالی‌های کوتاه‌تری از DNA انجام می‌گرفت. این توالی‌ها با ترتیب و جای‌گیری مشخص روی یک اسلاید قرار گرفته بودند. در آن زمان این روش matrix CGH نام گرفت. برای ساخت ماتریکس، ابتدا DNAی هدف بر روی لام‌های میکروسکوپی که با پلی- L- لیزین پوشیده شده بود، لکه‌گذاری شد و سپس به‌مدت پنج دقیقه در حرارت $۸۰^{o}C$ قرار گرفتند و در پی آن به‌مدت پنج دقیقه در محلول تثبیت‌کنندهٔ سرد (متانل: اسید استیک با نسبت ۱:۳) شناور شدند و بار دیگر پنج دقیقه حرارت دیدند. توالی‌های DNAی هدف روی اسلاید از جنس کازمید، ناقل‌های PAC و P۱ بودند. بررسی‌ها نشان داد این روش قدرت تفکیک CGH را از ۱۰Mb به ۱۰۰kb–۷۵ افزایش می‌دهد.[۲۷] اصول کلی آرایه CGH، مشابه CGH است. ابتدا از DNAی ژنومی نمونه و کنترل، کاوشگر فلئورسنت تهیه می‌شود. رنگ‌هایی که برای نشان‌دار کردن استفاده می‌شود معمولاً سیانین ۳ به‌رنگ سبز (cy3) و سیانین ۵ (cy5) به‌رنگ قرمز است. معمولاً DNAی نمونه با cy3 و کنترل با cy5 نشان‌دار می‌شود. در مرحله بعد این کاوشگرهای نشان‌دار بر روی یک اسلاید، که پیش‌تر مولکول‌های DNA با توالی مشخص روی آن لکه‌گذاری شده است، انتقال می‌یابند و فرایند دو رگه‌سازی با DNAی هدف بر روی اسلاید انجام می‌گیرد (شکل ۱). در آزمون Solinas-Toldo، فرایند لکه‌گذاری با لوله‌های مویین انجام گرفت، که امروزه روبات‌ها این کار را انجام می‌دهند. پس از دو رگه‌سازی، تجزیه و تحلیل‌های بعدی به‌کمک اسکنر ریز آرایه انجام می‌شود. از تصاویر حاصل از اسکنر، نسبت log2 شدت رنگ‌های cy3/cy5 برای هر توالی محاسبه می‌شود. این محاسبات با نرم‌افزار SeeGH انجام می‌گیرد.[۲۸] نسبت حاصل متناسب با نسبت تعداد نسخه‌های DNA در ژنوم آزمون و مرجع است و می‌تواند برابر با صفر، بزرگ‌تر و یا کوچک‌تر از آن باشد. چنانچه شدت نسبت رنگ‌های فلئورسنت برای یک پروب برابر باشد (log2 شدت رنگ‌های cy3/cy5=۰) فرد آزمون و کنترل مقدار مساوی DNA در آن توالی خاص دارند. در صورت کسب یک نسخه DNA در ژنوم فرد آزمون نسبت log2 برابر با ۰/۵۸+ و در صورت حذف تک نسخه این نسبت ۱- می‌باشد. در صورت حذف‌های هوموزیگوت این نسبت به ۴- و در شرایط تکثیر ژنی (Gene amplification) با شدت زیاد به شش و یا بیش‌تر می‌رسد.[۲۹]

در روش CGH برای دو رگه‌سازی از کروموزوم‌های متافازی به‌عنوان DNAی هدف استفاده می‌شد. این کروموزوم‌ها در دو رگه‌سازی ژنومی مقایسه‌ای ریزآرایه جایگزین شده‌اند. پروب‌هایی که امروزه در آرایه CGH استفاده می‌شود قطعه‌هایی از DNAی ژنوم انسان هستند که در اندازه‌های متفاوت بر روی اسلاید لکه‌گذاری می‌شوند؛ این پروب‌ها عبارتند از: همسانه (کلون)های کروموزوم مصنوعی باکتریایی Bacterial Artificial Chromosome (BAC) یا کروموزوم مصنوعی فاژ P_1 (PAC) با اندازهٔ ۲۰۰kb–۷۵ و یا قطعه‌هایی با اندازهٔ کوچک‌تر شامل کاسمید (۴۰kb–۳۰)، فازمید (۵۰kb–۴۰) و الیگونوکلئوتیدهایی با طول ۲۵ تا ۸۵ نوکلئوتید.[۲و۶و۷و۳۰]

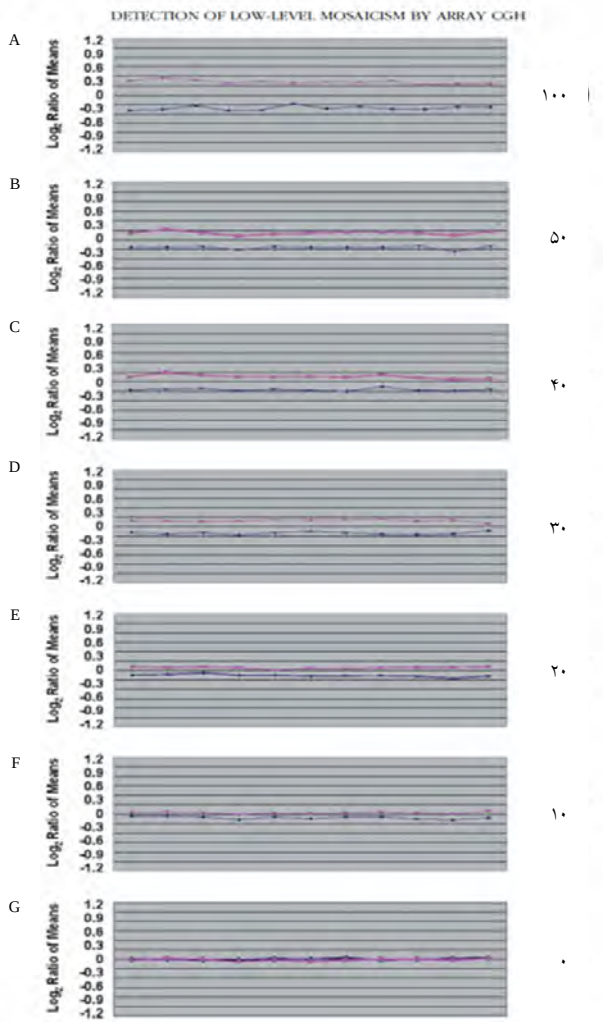
توانایی آرایه CGH در شناسایی موزاییسم: یکی‌از محدودیت‌هایی که برای فن CGH ذکر شد، عدم توانایی شناخت موزاییسم است. Ballif موفق شد به‌کمک دو رگه‌سازی ژنومی مقایسه‌ای ریز آرایه موزاییسم را شناسایی کند. وی ۳۶۰۰ مورد بالینی را از لحاظ انواع اختلالات کروموزومی شامل ریز حذفی، دوتاشدگی، تغییرات آنیوپلوییدی، جابه‌جایی‌های نامتعادل و برخی تغییرات دیگر با فن آرایه CGH بررسی کرد. در بین این افراد ۱۸ مورد موزاییسم گزارش شد که وضعیت موزاییسم چهار نفر مشخص و در سایر موارد شناسایی نشد. در آرایه CGH برای هر حذف یا کسب یک حد آستانه در نظر گرفته می‌شود. در موزاییسم، ناهنجاری در همه سلول‌ها دیده نمی‌شود، شدت فلئورسنت و نسبت تعداد نسخه‌های مشاهده شده در بیمار به کنترل از حد مورد انتظار کم‌تر است (شکل ۲). چنین نتایجی در مورد این بیماران مشاهده شد. فن FISH این نتایج را تأیید کرد.[۳۱]

کاربردهای آرایه CGH در تشخیص: فن دو رگه‌سازی ژنومی مقایسه‌ای دور نمای نویدبخشی برای تشخیص ناهنجاری‌های ژنومی و تشخیص پیش از تولد دارد. از جمله مزایای این فن بر تهیهٔ



شکل-۱: الف) مولکول‌های DNA با توالی مشخص روی یک اسلاید لکه‌گذاری می‌شوند. ب) از DNAی ژنومی آزمون‌و کنترل کاوشگر فلئورسنت تهیه و رنگ‌های مورد استفاده در نشان‌دار کردن سیانین ۳ (cy3) و سیانین ۵ (cy5) می‌باشد. سپس این کاوشگرهای نشان‌دار بر روی اسلاید منتقل و دو رگه‌سازی با DNAی هدف انجام می‌گیرد. تحلیل با اسکنر ریز آرایه انجام و از تصاویر اسکنر، نسبت log2 شدت رنگ‌های cy3/cy5 برای هر توالی محاسبه می‌شود.[۱۴]

کاریوتایپ قدرت تفکیک بالا (۵Mb در کاریوتایپ استاندارد در برابر ۱۰۰Kb در آرایه CGH)، سرعت بالای انجام آزمایش و قابلیت خودکاری آن است. از زمان ایجاد روش‌های نواربندی کروموزوم‌ها (۱۹۷۰)،[۵] تجزیه و تحلیل میکروسکوپی استاندارد زرین تشخیص‌های پیش از تولد بوده است.[۲و۳۲] در تهیهٔ کاریوتایپ ابتدا باید کروموزوم‌ها کشت داده شوند؛ بنابراین تشخیص بر اساس کاریوتایپ دست‌کم حداقل دو هفته به درازا خواهد انجامید. این در حالی است که در آرایه CGH نیازی به کشت کروموزوم‌ها نیست و همین مسئله سرعت تشخیص را بالا می برد. نتیجه‌گیری سریع، به‌ویژه در تشخیص‌های پیش از تولد که زمان محدود است، با اهمیت می‌باشد. برای تأیید کارایی دو رگه‌سازی ژنومی مقایسه‌ای در تشخیص پیش از تولد، Bi در آزمایشی ۱۵ جنین از ۱۴ بارداری متفاوت را انتخاب کرد، این نمونه‌ها با فن Oligonucleotide array CGH هدف‌دار مطالعه شدند.[۳۳] DNAی آزمون به‌طور مستقیم و بدون کشت از مایع آمنیوتیک جدا شد و با آرایه CGH مورد مطالعه قرار گرفت. در ۱۳ مورد نتایج با کیفیت و کارایی بالا مشاهده شد. در دو مورد دیگر به دلیل میزان کم



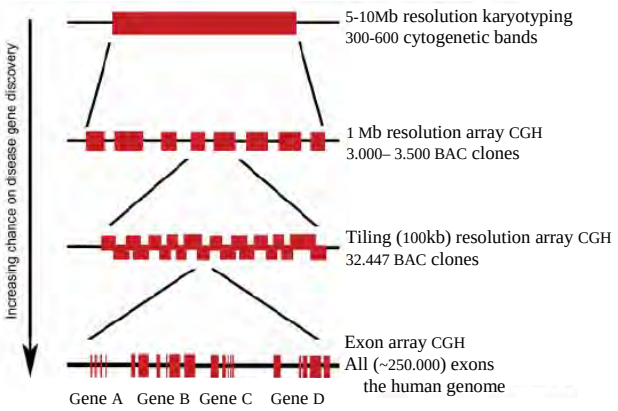
شکل-۲: شناسایی سطوح پایین موزاییسم به‌وسیله آرایه CGH.[۳۱]

DNA نتیجه مطلوب به‌دست نیامد.[۳۳] همچنین Law در سال ۲۰۰۹ با کمک فن دو رگه‌سازی ژنومی مقایسه‌ای، ریز حذفی 16p13.11 را در جنینی با شفافیت پشت گردن شناسایی کرد. کاریوتایپ این جنین وضعیت طبیعی 46,XY را نشان می‌داد. حذف 16p13.11 استعداد ابتلا به اوتیسم و عقب‌ماندگی ذهنی ایجاد می‌کند. بررسی‌های بعدی روی این جنین هیچگونه علایمی از عقب‌ماندگی ذهنی و تأخیر رشد را نشان نداد. شایان ذکر است که یکی از مهمترین محدودیت‌های آرایه CGH در تشخیص‌های پیش از تولد، تفسیر نتایج است، به‌خصوص در مواردی که علایم بالینی یک تغییر کروموزومی خاص دقیقاً مشخص نیست. از این رو استفاده گسترده از دو رگه‌سازی ژنومی مقایسه‌ای در تشخیص‌های پیش از تولد نیازمند پژوهش‌های گسترده

است.[۳۴] افزون بر کاربردهای فن دو رگه‌سازی ژنومی مقایسه‌ای در تشخیص‌های پیش‌از تولد، این فن را می‌توان کاندید مناسبی برای تشخیص‌های پیش از لانه گزینی به‌شمار آورد. Hu D G نوعی آرایه CGH طراحی کرد که قادر است همه ۲۴ کروموزوم انسان را از نظر آنیوپلوییدی، تعیین جنسیت و ناهنجاری‌های کروموزوم‌های جنسی، تنها در یک سلول بررسی کند.[۳۵] با بهبود روش و افزایش کارایی، آرایه CGH به ابزاری قدرتمند برای تشخیص‌های پیش از تولد و پیش از لانه گزینی تبدیل می‌گردد. آرایه CGH در تشخیص با محدودیت‌هایی نیز روبرو است. از این فن تنها برای شناسایی ناهنجاری‌های عددی و ساختاری کروموزوم می‌توان استفاده کرد و سایر انواع جهش‌ها؛ مانند جهش‌های نقطه‌ای با این فن قابل شناسایی نیستند. مسئله بعدی وجود چند شکلی در ژنوم است. دو رگه‌سازی ژنومی مقایسه‌ای قادر است تمام تغییرات مقداری را شناسایی کند، بنابراین حذف‌ها و مضاعف‌شدگی‌هایی که هیچ‌گونه اثر فنوتیپی مشخصی ندارند نیز توسط آرایه CGH شناسایی می‌شوند. بسیاری از تغییراتی که توسط آرایه CGH به‌عنوان علت ناهنجاری ایدیوپاتیک معرفی می‌شوند با مطالعات بیشتر، چندشکلی ژنومی شناسایی شدند. در پژوهشی که بر روی ۴۹ جنین با بدشکلی‌های متفاوت با پاتولوژی ظاهراً نامعلوم انجام گرفت دوتاشدگی زیرتلومری ۱۰q در سه نمونه مشاهده شد. اخیراً مشخص شده است که این دوتاشدگی یک نوع چند شکلی رایج ژنومی است.[۳۶] نمونه‌های بسیاری از این دست در پژوهش‌های آرایه CGH شناسایی شده است.[۳۷و۳۸] در صورت استفاده از آرایه CGH در تشخیص‌های پیش از تولد، افزون بر آزمونه باید نمونه والدین نیز بررسی شود. به این ترتیب احتمال نتیجه‌گیری‌های نادرست بر اساس تغییراتی که ممکن است چند شکلی باشند، کاهش می‌یابد. در سال‌های اخیر به‌منظور افزایش دقت در تحلیل نتایج آرایه CGH بررسی‌هایی با هدف شناسایی لوکوس‌های چندشکل انجام شده است. در این مطالعات تنوع تعداد نسخه‌های بدون اثر فنوتیپی Copy Number Variant (CNV)، شناسایی می‌شوند.[۳۹و۴۰]

کاربردهای آرایه CGH در سرطان‌شناسی: ژنوم سلول‌های توموری دستخوش تغییرات عددی و ساختاری بسیاری می‌شود که به‌دلیل اندازهٔ کوچک، توسط سایر روش‌هایی که برای تعیین تغییرات ساختاری کروموزوم‌ها استفاده می‌شد شناسایی نشده‌اند. به کمک آرایه CGH می‌توان الگوی تغییرات تعداد نسخه‌های DNA در هر تومور را تعیین کرد. هر تومور نمایهٔ آرایه CGH مشخصی دارد، دانستن این نمایه کاربردهای پرشماری را در سرطان‌شناسی فراهم آورده است. مطالعاتی که با روش آرایه CGH روی سلول‌های توموری انجام شده، توانسته است تغییرات تعداد نسخه‌های DNA را با قدرت تفکیک بالا نشان دهد، هم‌چنین می‌توان الگوی تغییر در تعداد نسخه‌های DNA را در مراحل گوناگون پیشرفت سرطان بررسی کرد.[۴۱] در مطالعه Chochi در کارسینوم هپاتوسلولار، ۴۲ تومور با روش آرایه CGH بررسی شدند. نتایج این بررسی، کسب نسخه‌های DNA را بر روی 8q -1q و xq نشان می‌داد. هم‌چنین کسب شدگی در 1q42.12، 1q43 و 8q24.3 در بیش از ۶۵٪ تومورها مشاهده می‌شد. حذف‌شدگی‌ها عمدتاً بر روی نواحی کروموزومی 1p، 4q، 6q، 8q و 17p قرار داشتند. همچنین الگوی حذف/ کسب ارتباط مشهودی با مراحل گوناگون توموری نشان داد، برای نمونه کسب در 6q و 8q24.12 در تومورهای مرحلهٔ III/ IV بیش‌تر مشاهده می‌شود.[۴۲] تغییرات عددی اختصاصی یک مرحله را می‌توان به‌عنوان نشان‌گری برای شناسایی و تشخیص استفاده کرد. تخمین احتمال بازگشت موضعی سرطان پستان توسط این نوع نشان‌گرها بررسی شده است. در پژوهش Climent، ۳۱ بیمار سرطان پستان با عود پس از پنج سال انتخاب شدند و الگوی تغییرات تعداد نسخه‌های ژنومی در سلول‌های توموری این افراد با کمک فن آرایه CGH مطالعه شد. این الگو با نمونه‌های مربوط به افرادی که تودهٔ توموری پستان پنج سال پیش جراحی شده و هنوز عود نکرده بود، مقایسه شد. تغییرات عمده کسب در نواحی ۵p۱۵.۳۳، ۱۱q۱۳.۳، ۱۵q۲۶.۳، ۱۷q۲۵.۳، ۱۸q۲۳، ۲۱q۲۲.۳ و حذف در ۹p۱۲، ۱۱q۴.۱ و ۱۴q۳۲.۳۳ مشاهده شدند. بر اساس این نتایج می‌توان الگوی خطر عود دوباره سرطان را پیش‌بینی کرد.[۴۳] این نوع مطالعات کاربرد بالایی از پیش‌آگهی بیماری و درمان دارند. به‌کمک آرایه CGH می‌توان بین شکل تک‌گیر و وراثتی تومورها تمایز قایل شد. پروفایل (نیم‌رخ) تغییرات ژنومی در روند پیشرفت شکل تک‌گیر و وراثتی تومورها متفاوت است و آرایه CGH آن‌را نشان داد. پیش‌تر تصور بر آن بود که ژن‌های یکسانی در ایجاد مشکل وراثتی و تک‌گیر تومور نقش دارند، مطالعات با کمک دورگه‌سازی ژنومی مقایسه‌ای ریز آرایه، این فرضیه را رد کرد.[۴۴]

کاربرد آرایه CGH در شناسایی ژن‌های درگیر در بیماری‌ها: افزایش قدرت تفکیک روش‌های مطالعه ژنوم‌شانس شناسایی ژن‌های درگیر



شکل-۳: تاثیر افزایش قدرت تفکیک روش‌های مطالعه ژنوم بر شناسایی ژن‌های درگیر در بیماری‌زایی.[۴۸]

در بیماری را افزایش داده است (شکل ۳). یک نمونه کاربرد فن آرایه CGH در شناسایی ژن‌های درگیر در بیماری را در خصوص نشانگان CHARGE می‌بینیم. نشانگان CHARGE (OMIM NO.214800) یک ناهنجاری پلیوتروپیک است که به‌شکل coloboma، ناهنجاری‌های قلبی، آترزی کوآن، تأخیر در رشد، هایپوپلازی دستگاه تناسلی و ناهنجاری‌های گوش و ناشنوایی بروز می‌کند.[۴۵] دلیل این نشانگان برای سال‌ها ناشناخته بود. Visses موفق شد با استفاده از آرایه CGH ژن عامل CHARGE را شناسایی کند.[۴۶] در این مطالعه ژنوم ۱۸ بیمار مبتلا به CHARGE با استفاده از آرایهٔ BAC با قدرت تفکیک ۱Mb بررسی شد. در یک بیمار، یک ریز حذفی با اندازهٔ ۴/۸Mb بر روی 8q12 شناسایی شد. پیش از این نیز جابه‌جایی متعادل کروموزوم هشت در یک بیمار دیگر شناسایی شده بود.[۴۷] ۱۷ بیمار فاقد هر گونه ریز حذفی در کروموزوم هشت بودند. مطالعهٔ توالی نوکلئوتیدی ۹ ژن موجود در این ناحیه به شناسایی ژن عامل بیماری یعنی CHD7 منجر شد. این مطالعه نشان داد علت اصلی نشانگان CHARGE عدم کفایت هاپلوییدی در ژن CHD7 است. عدم کفایت هاپلوییدی می‌تواند در اثر جهش نقطه‌ای و یا ریز حذفی ایجاد شود. فرآورده ژن CHD7 از خانوادهٔ پروتیین Chromodomain است. این مطالعه نشان داد که می‌توان از آرایه CGH به‌عنوان ابزار مناسبی برای شناسایی ژن‌های درگیر در بیماری‌ها استفاده کرد. هر چند که این استفاده محدودیت‌هایی مانند؛ نوع جهش و قدرت تفکیک نیز دارد. آرایه CGH از طریق شناسایی حذف‌شدگی‌ها، ژن‌های درگیر در بیماری‌زایی (پاتوژنز) بیماری را شناسایی می‌کند، به این ترتیب استفاده از فن دورگه‌سازی ژنومی مقایسه‌ای تنها برای شناسایی ژن‌هایی کاربرد دارد که در اثر حذف‌شدگی موجب بروز بیماری می‌گردند، مکانیسم بیماری‌زایی این دسته از ژن‌ها عدم کفایت هاپلوییدی است. نکتهٔ دیگر قابل توجه این است که تنها حذف‌هایی (یا دوتا شدگی‌ها) قابل شناسایی هستند که در محدودهٔ قدرت تفکیک این فن یعنی ۵۰-۱۰۰kb باشند و تغییرات کوچک‌تر قابل شناسایی توسط فن آرایه CGH نیستند.[۴۸]

کاربرد آرایه CGH در شناسایی جهش‌های درگیر در بیماری‌ها: آرایه CGH توانسته است برخی جهش‌های ناشناخته در اختلالات ژنتیکی را شناسایی کند. بیماری‌های دیستروفی عضلانی دوشن و دیستروفی عضلانی بکر، بیماری‌هایی با وراثت وابسته به x هستند که به‌دلیل جهش در ژن DMD ایجاد می‌شوند. ژن دیستروفین (#۳۰۰۳۷۷ OMIM؛ DMD) بزرگ‌ترین ژن موجود در ژنوم انسان است که در ناحیه‌ای به طول ۲/۴Mb روی کروموزوم xp۲۱ قرار گرفته است. ژنوم را شامل می‌شود. این ژن دارای ۷۹ اگزون است و افزون بر عضله در بافت‌های دیگری از جمله مغز بیان می‌شود. نقص یا فقدان کامل فرآورده ژن دیستروفین (پروتیین دیستروفین) می‌تواند موجب نکروز سلول‌های عضلانی و در نتیجه ضعف عضلانی در مبتلایان گردد. ظاهراً توزیع این حذف‌ها در طول ژن کاملاً غیر تصادفی است و بیش‌تر در نواحی '5 و مرکزی ژن تجمع یافته‌اند. حدود ۱۵-۵ درصد موارد نیز در اثر دوتاشدگی‌ها ایجاد می‌شود.[۲و۷و۴۹] دو سوم موارد DMD به‌دلیل حذف‌های درون ژنی رخ می‌دهد. روشی که امروزه به‌شکل گسترده برای تشخیص به‌کار می‌رود PCR چندگانه (Multiplex PCR) است. PCR چندگانه روشی سریع و مناسب برای شناسایی DMD است، اگرچه معایب عمده‌ای هم دارد از جمله این‌که از آن می‌توان تنها برای شناسایی حذف در مردان مبتلا استفاده کرد. با توجه به وجود دو کروموزوم X در زنان حتی در صورت رخداد حذف یک نسخه از ژن، نسخه دیگر توسط PCR تکثیر می‌شود، به این ترتیب شناسایی زنان هتروزیگوت (حامل) با این روش امکان‌پذیر نیست. هم‌چنین به کمک این روش نمی‌توان دوتاشدگی‌ها را تشخیص داد.[۲و۵۰و۵۱] حدود ۲۵ تا ۳۰ درصد از موارد، که دچار حذف یا مضاعف‌شدگی نمی‌شوند، در اثر جهش‌های نقطه‌ای ایجاد می‌گردند. این جهش‌ها با روش‌های تعیین توالی قابل شناسایی هستند. پژوهشگران احتمال می‌دهند موارد باقیمانده که جهش‌های آن‌ها هنوز شناسایی نشده است در اثر باز آرایی‌ها، جهش‌های اینترون

و یا تغییر در ناحیهٔ UTR ´۳-´ ۵ است.[۵۱] در آزمایشی برای بررسی همه جهش‌ای محتمل در ژن DMD، نوعی فن آرایه CGH با چگالی بالا، برای تمام طول ژن DMD و همچنین ۱۰۰Kb ± ژن توسط Bovolenta طراحی شد. مطالعه روی ۱۲ بیمار مبتلا به DMD/BMD انجام گرفت. در این مطالعات سه باز آرایی اینترونی جدید مشاهده شد. هم‌چنین این گروه موفق شدند، همه نقاط شکست جهش‌ها در نواحی اینترونی و ´۳UTR را شناسایی کنند. با وجود قدرت تفکیک بالای این روش، نتایج باید به‌کمک تجزیه و تحلیل بیان RNA تایید می‌شد؛ به‌این منظور مجموعه RNA از بیوپسی عضله مبتلایان استخراج شد و پس از سنتز cDNA رونوشت مربوط به ژن دیستروفین مطالعه شد. فن RNA هم‌چنین توانست جهش‌های کوچک در نواحی اینترونی که پیرایش (Splicing) را تحت تاثیر قرار می‌دادند و توسط آرایه CGH شناسایی نشده بود شناسایی کند. تأکید می‌نماید آرایه CGH قادر است، بسیاری از جهش‌هایی را که تا پیش از این شناسایی نشده بود، شناسایی کند؛ این مسئله دامنه و دقت تشخیص را بسیار بالا خواهد برد.[۵۲] ترکیب دورگه‌سازی ژنومی مقایسه‌ای و سایر فنون شناسایی جهش، امر تشخیص و درمان بیماری‌ها را بسیار قدرتمند خواهد کرد.[۷] با توجه به چشم‌انداز مطلوب آرایه CGH در شناسایی سبب‌شناسی بیماری‌هایی با دلایل ظاهراً نامشخص، مطالعات نویدبخشی با کمک این فن روی بیماری‌های قلبی مادرزادی Congenital Heart Defect (CHD) انجام گرفت. بیماری‌های قلبی مادرزادی یکی از رایج‌ترین نواقص بدو تولد بوده و حدود ۱٪ نوزادان را مبتلا می‌کند. سهم عوامل محیطی مانند جهش‌زاها و بیماری مادر در ایجاد بیماری اندک است، به همین دلیل باید عوامل ژنتیکی اصلی دخیل در ایجاد بیماری شناسایی شوند.[۵۳] ناهنجاری‌های کروموزومی یکی از دلایل اصلی CHD نشانگانی هستند، اگر چه این پرسش که آیا این اختلالات در موارد غیر نشانگانی نیز نقش دارند یا خیر، مسئله‌ای است که باید بررسی شود. در آزمایشی ۱۰۵ بیمار با CHD غیر نشانگانی بررسی شدند. نتایج حاصل از فن آرایه CGH، ۱۸ تغییر کروموزومی را در این مبتلایان شناسایی کرد، که هیچ‌کدام چندشکلی نبودند. این ناهنجاری‌ها شامل یک حذف و یک دوتاشدگی de Novo و هشت تغییر در تعداد نسخه‌های به ارث رسیده، بودند. پس از شناسایی نواحی درگیر، با انجام مطالعات بعدی نقش این نواحی در بیماری‌زایی بیماری (درگیری مستقیم) و یا افزایش خطر ابتلا به CHD مشخص خواهد شد.[۵۴] فن دورگه‌سازی ژنومی مقایسه‌ای ریز آرایه، پنجره جدیدی را به‌سمت تشخیص‌های پیش از تولد CHD، یافتن پاتوژنز بیماری و ارتباط ژنوتیپ- فنوتیپ و مشاورهٔ ژنتیک گشوده است. دستهٔ دیگر بیماری‌های با دلایل نامشخص، عقب‌ماندگی‌های ذهنی Mental Retardation (MR) است. در ایجاد عقب‌ماندگی‌های ذهنی عوامل محیطی و ژنتیکی نقش دارند، احتمالاً ناهنجاری‌های کروموزومی رایج‌ترین دلیل ژنتیکی MR و تاخیر رشد است. این ناهنجاری با قدرت تفکیک روش‌های رایج سیتوژنتیکی قابل شناسایی نیستند.[۳۷] دورگه‌سازی ژنومی مقایسه‌ای ریز آرایه، با استفاده از قابلیت‌های فراوان خود، توانسته است بسیاری از این ناهنجاری‌های زیر میکروسکوپی را شناسایی کند. حذف و دوتاشدگی ساب تلومری 1p36.3 در کودکی با عقب‌ماندگی و نئوپلاسم نئوناتال،[۵۵] مونوزومی 19pter و تری زومی 19q13-qter در خواهر و برادری با عقب‌ماندگی ذهنی، میکروسفالی و بدشکلی ملایم چهره،[۵۶] حذف (p32.2-32.3)۱ در فردی با تاخیر رشد و عقب‌ماندگی ذهنی، سطح پایین کلسترول و بد شکلی‌های دیگر[۵۷] و ده‌ها نمونه دیگر حاصل بررسی‌های ژنومی با آرایه CGH است. نکتهٔ جالب نرخ پایین بازگشت این حذف‌شدگی‌ها و دوتا شدگی‌ها است. به این ترتیب که نمی‌توان یک تغییر ویژه را به تکرار در جمعیت مبتلایان مشاهده کرد. این مسئله که به هتروژنی ژنتیکی بالای عقب‌ماندگی-های ذهنی مربوط می‌شود، استفاده از فنونی با توانایی بررسی همزمان کل ژنوم را ایجاب می‌کند.[۳۷]

افزون بر تعیین جهش، با مطالعه روی ژن‌های شناخته شده در هر ناحیه، ارتباط ژنوتیپ- فنوتیپ مشخص خواهد شد. این مطالعات به کمک آرایه CGH برای نشانگان داون انجام گرفته و نواحی اصلی درگیر در ایجاد آن شناسایی شده است. نتایج این مطالعه وجود یک ناحیهٔ اصلی درگیر را رد می‌کند، ۲۵ ناحیهٔ احتمالی برای بروز فنوتیپ‌های داون در نظر گرفته شده است.[۵۸] فن دورگه‌سازی ژنومی مقایسه‌ای، با عمر حدود یک دهه، تحول بنیادی در دانش سیتوژنتیک مولکولی را فراهم آورده است. با توجه به روند رو به رشد مقالات بر اساس آرایه CGH، قابلیت بالا و کابردهای فراوان این فن تایید می‌شود. امید است با بهبود فن آرایه CGH و استفاده از آن در کنار سایر روش‌ها شاهد پیشرفت در تشخیص، درمان و مشاوره سرطان و بیماری‌های ژنتیکی باشیم.

References

1. Tjio JH, Levan A. The chromosome numbers of man. *Hereditas* 1956:42:1-6.

۲. نوری دلوئی محمدرضا. ترجمه و تألیف: اصول ژنتیک پزشکی امری (پیترترنپی- سیان الارد، ویرایش سیزدهم ۲۰۰۷) همراه با فرهنگ واژه ها، چاپ پنجم، انتشارات جامعه نگر و سالمی، اردیبهشت ۱۳۸۸ (برنده دومین دوره کتاب فصل، وزارت فرهنگ و ارشاد اسلامی، ۱۳۸۶ و کتاب برگزیده تقدیر سال ۱۳۸۸).

3. Oostlander AE, Meijer GA, Ylstra B. Microarray-based comparative genomic hybridization and its applications in human genetics. *Clin Genet* 2004;66(6):488-95.
4. Trask BJ. Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. *Nat Rev Genet* 2002;3(10):769-78.
5. Caspersson T, Farber S, Foley GE, Kudynowski J, Modest EJ, Simonsson E, et al. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp Cell Res* 1968;49(1):219-22.
6. Shinawi M, Cheung SW. The array CGH and its clinical applications. *Drug Discov Today* 2008;13(17-18):760-70.

۷. نوری دلوئی محمدرضا. (مؤلف) ژنتیک مولکولی در هزار سوم، جلد ۱ و جلد ۲. تهران: انتشارات سامر و نشر آخر؛ چاپ اول؛ مهرماه ۱۳۸۸.

8. Yunis JJ. High resolution of human chromosomes. *Science* 1976;191(4233):1268-70.
9. Rudkin GT, Stollar BD. High resolution detection of DNA-RNA hybrids in situ by indirect immunofluorescence. *Nature* 1977;265(5593):472-3.
10. Smeets DF. Historical prospective of human cytogenetics: from microscope to microarray. *Clin Biochem* 2004;37(6):439-46.

۱۱. نوری دلویی محمدرضا. نظری بر حال و آینده مهندسی ژنتیک و پزشکی مولکولی. مجله نبض ۱۳۷۴: سال ۴، شماره ۱۰: صفحات ۴ تا ۱۰.

12. Tönnies H. Modern molecular cytogenetic techniques in genetic diagnostics. *Trends Mol Med* 2002;8(6):246-50.
13. Henegariu O, Artan S, Greally JM, Chen XN, Korenberg JR, Vance GH, et al. Cryptic translocation identification in human and mouse using several telomeric multiplex fish (TM-FISH) strategies. *Lab Invest* 2001;81(4):483-91.
14. Shaffer LG, Bejjani BA. A cytogeneticist's perspective on genomic microarrays. *Hum Reprod Update* 2004;10(3):221-6.
15. Gouas L, Goumy C, Véronèse L, Tchirkov A, Vago P. Gene dosage methods as diagnostic tools for the identification of chromosome abnormalities. *Pathol Biol (Paris)* 2008;56(6):345-53.
16. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992;258(5083):818-21.
17. Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD, et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* 2005;436(7050):518-24.
18. Rydzanicz M, Giefing M, Ziolkowski A, Kasprzyk M, Gabriel A, Dyszkiewicz W, et al. Nonrandom DNA copy number changes related to lymph node metastases in squamous cell carcinoma of the lung. *Neoplasma* 2008;55(6):493-500.
19. Noori-Daloii MR, Swift RA, Kung HJ, Crittenden LB, Witter RL. Specific integration of REV proviruses in avian bursal lymphomas. *Nature* 1981;294(5841):574-6.
20. Shahabi M, Noori Daloii MR, Langan JE, Rowbottom L, Jahanzad E, Khoshbin E, et al. An investigation of the tylosis with oesophageal cancer (TOC) locus in Iranian patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2004;25(2):389-95.
21. Momeny M, Khorramizadeh MR, Ghaffari SH, Yousefi M, Yekaninejad MS, Esmaeili R, et al. Effects of silibinin on cell growth and invasive properties of a human hepatocellular carcinoma cell line, HepG-2, through inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation. *Eur J Pharmacol* 2008;591(1-3):13-20.
22. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55(2):74-108.
23. Garcia M, Jemal A, Ward EM, Center MM, Hao Y, Siegel RL, et al. Global Cancer Facts & Figures 2007. Atlanta, GA: American Cancer Society, 2007.
24. Liu XP, Li DY, Liu XL, Xu JD, Furuya T, Kawauchi S, et al. Comparison of chromosomal aberrations between primary tumors and their synchronous lymph-node metastases in intestinal-type gastric carcinoma. *Pathol Res Pract* 2009;205(2):105-11.
25. Levy B, Dunn TM, Kaffe S, Kardon N, Hirschhorn K. Clinical applications of comparative genomic hybridization. *Genet Med* 1998;1(1):4-12.
26. Bayani J, Squire JA. Comparative genomic hybridization. *Curr Protoc Cell Biol* 2005;Chapter 22:Unit 22.6.
27. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Döhner H, et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 1997;20(4):399-407.
28. Kennett JY, Watson SK, Saprunoff H, Heryet C, Lam WL. Technical demonstration of whole genome array comparative genomic hybridization. *J Vis Exp* 2008;(18). pii: 870. doi: 10.3791/870.
29. Snijders AM, Pinkel D, Albertson DG. Current status and future prospects of array-based comparative genomic hybridisation. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2003;2(1):37-45.

۳۰. نوری دلویی محمدرضا. ژنتیک پزشکی در هزاره سوم ، چاپ شده در کتاب اولین همایش ملی تازه های سلولی- مولکولی در بیماری های غیر واگیر. دانشگاه علوم پزشکی بابل ۱۳۸۸: صفحه های ۱۸- ۳۲.

31. Ballif BC, Rorem EA, Sundin K, Lincicum M, Gaskin S, Coppinger J, et al. Detection of low-level mosaicism by array CGH in routine diagnostic specimens. *Am J Med Genet A* 2006;140(24):2757-67.
32. Shaffer LG, Bejjani BA, Torchia B, Kirkpatrick S, Coppinger J, Ballif BC. The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities: cytogenetic methods of the past, new technologies for the future. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2007;145C(4):335-45.
33. Bi W, Breman AM, Venable SF, Eng PA, Sahoo T, Lu XY, et al. Rapid prenatal diagnosis using uncultured amniocytes and oligonucleotide array CGH. *Prenat Diagn* 2008;28(10):943-9.
34. Law LW, Lau TK, Fung TY, Leung TY, Wang CC, Choy KW. De novo 16p13.11 microdeletion identified by high-resolution array CGH in a fetus with increased nuchal translucency. *BJOG* 2009;116(2):339-43.
35. Hu DG, Guan XY, Hussey N. Gender determination and detection of aneuploidy in single cells using DNA array-based comparative genomic hybridization. *Methods Mol Med* 2007;132:135-51.
36. Le Caignec C, Boceno M, Saugier-Veber P, Jacquemont S, Joubert M, David A, et al. Detection of genomic imbalances by array based comparative genomic hybridisation in fetuses with multiple malformations. *J Med Genet* 2005;42(2):121-8.
37. de Vries BB, Pfundt R, Leisink M, Koolen DA, Vissers LE, Janssen IM, et al. Diagnostic genome profiling in mental retardation. *Am J Hum Genet* 2005;77(4):606-16.
38. Shaw-Smith C, Redon R, Rickman L, Rio M, Willatt L, Fiegler H, et al. Microarray based comparative genomic hybridization (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *J Med Genet* 2004;41(4):241-8
39. Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, et al. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* 2004;36(9):949-51.
40. Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, et al. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 2004;305(5683):525-8.

41. Davies JJ, Wilson IM, Lam WL. Array CGH technologies and their applications to cancer genomes. *Chromosome Res* 2005;13(3):237-48.
42. Chochi Y, Kawauchi S, Nakao M, Furuya T, Hashimoto K, Oga A, et al. A copy number gain of the 6p arm is linked with advanced hepatocellular carcinoma: an array-based comparative genomic hybridization study. J Pathol 2009;217(5):677-84.
43. Hwang KT, Han W, Cho J, Lee JW, Ko E, Kim EK, et al. Genomic copy number alterations as predictive markers of systemic recurrence in breast cancer. *Int J Cancer* 2008;123(8):1807-15.
44. Climent J, Garcia JL, Mao JH, Arsuaga J, Perez-Losada J. Characterization of breast cancer by array comparative genomic hybridization. *Biochem Cell Biol* 2007;85(4):497-508.
45. Pagon RA, Graham JM Jr, Zonana J, Yong SL. Coloboma, congenital heart disease, and choanal atresia with multiple anomalies: CHARGE association. *J Pediatr* 1981;99(2):223-7.
46. Vissers LE, van Ravenswaaij CM, Admiraal R, Hurst JA, de Vries BB, Janssen IM, et al. Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. *Nat Genet* 2004;36(9):955-7.
47. Hurst JA, Meinecke P, Baraitser M. Balanced t(6;8)(6p8p;6q8q) and the CHARGE association. *J Med Genet* 1991;28(1):54-5.
48. Vissers LE, Veltman JA, van Kessel AG, Brunner HG. Identification of disease genes by whole genome CGH arrays. *Hum Mol Genet* 2005;14 Spec No. 2:R215-23.
۴۹. نوری دلویی محمدرضا، خسروی نیا سامیه، مجید فر فرهت. فرهنگ مهندسی ژنتیک؛ انتشارات مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی، چاپ اول. تهران: ۱۳۷۳.
50. del Gaudio D, Yang Y, Boggs BA, Schmitt ES, Lee JA, Sahoo T, et al. Molecular diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy: enhanced detection of dystrophin gene rearrangements by oligonucleotide array-comparative genomic hybridization. *Hum Mutat* 2008;29(9):1100-7.
۵۱. نوری دلویی محمدرضا، فریور شیرین. ژنتیک مولکولی و ژن درمانی در مبتلایان به دیتسروفی ماهیچه ای دوشن. مجله رازی ۱۳۷۷: سال ۹، شماره ۵: صفحات ۸ تا ۳۰. (مقاله بازآموزی)
52. Bovolenta M, Neri M, Fini S, Fabris M, Trabanelli C, Venturoli A, et al. A novel custom high density-comparative genomic hybridization array detects common rearrangements as well as deep intronic mutations in dystrophinopathies. *BMC Genomics* 2008;9:572.
53. Hoffman JI, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2002;39(12):1890-900.
54. Erdogan F, Larsen LA, Zhang L, Tümer Z, Tommerup N, Chen W, et al. High frequency of submicroscopic genomic aberrations detected by tiling path array comparative genome hybridisation in patients with isolated congenital heart disease. *J Med Genet* 2008;45(11):704-9.
55. Chen E, Obolensky E, Rauen KA, Shaffer LG, Li X. Cytogenetic and array CGH characterization of de novo 1p36 duplications and deletion in a patient with congenital cataracts, hearing loss, choanal atresia, and mental retardation. *Am J Med Genet A* 2008;146A(21):2785-90.
56. Schluth-Bolard C, Till M, Rafat A, Labalme A, Le Lorc'h M, Banquart E, et al. Monosomy 19pter and trisomy 19q13-qter in two siblings arising from a maternal pericentric inversion: clinical data and molecular characterization. *Eur J Med Genet* 2008;51(6):622-30.
57. Mulatinho M, Llerena J, Leren TP, Rao PN, Quintero-Rivera F. Deletion (1)(p32.2-p32.3) detected by array-CGH in a patient with developmental delay/mental retardation, dysmorphic features and low cholesterol: A new microdeletion syndrome? *Am J Med Genet A* 2008;146A(17):2284-90.
58. Lyle R, Béna F, Gagos S, Gehrig C, Lopez G, Schinzel A, et al. Genotype-phenotype correlations in Down syndrome identified by array CGH in 30 cases of partial trisomy and partial monosomy chromosome 21. *Eur J Hum Genet* 2009;17(4):454-66.

Tehran University Medical Journal; Vol. 68, No. 1, Apr 2010: 1-11

Applications of comparative genomic hybridization in cancer and genetic disorders: *a review article*

Mohammad Reza Noori-Daloii M.S., Ph.D.*
Nazanin Jalilian

Department of Medical Genetics

Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: January 19, 2010 Accepted: February 10, 2010

Abstract

Since the recognition of true number of human chromosomes in 1956, many techniques have been developed to detect chromosomal aberrations. A number of those, such as karyotyping and fluorescence in situ hybridization (FISH), are valuable tools in both research and diagnostics. But these techniques have defects that limit their application. One of the important limitations is resolution; resolution limitations make it impossible to detect small aberrations. The other major defect is the disability to analyze whole genome. In 1997 Solinas-Toldo introduced a new technique that could cover other techniques' defects. This new technique called microarray-based comparative genomic hybridization (array CGH). Array CGH, with the powerful resolution of FISH and also the ability of whole genome analysis in single experiment accelerated the genetic research. Array CGH has resulted in to a great progress in oncology and genetic disorders research. In addition, this technique has the ability to be used in diagnostics too. This review article, witch include the data of recent published papers and our experiences, gives an overview of the array CGH and compare it with the other molecular cytogenetic techniques. Its application in oncology and genetic disorder is also discussed.

Keywords Comparative genomic hybridization, fluorescence in situ hybridization, cancer, genetic disorder.

* Corresponding author: School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Tel: +98-21-88953005
email: nooridaloii@sina.tums.ac.ir