

ПРАВИТЕЛЬСТВО МОСКВЫ
ДЕПАРТАМЕНТ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ГОРОДА МОСКВЫ

СОГЛАСОВАНО

Главный внештатный
специалист по медицинской генетике
Департамента здравоохранения
города Москвы
д.м.н., профессор

 Н.С. Демикова

«19 июня» 2024 г.

РЕКОМЕНДОВАНО

Экспертным советом по науке
Департамента здравоохранения
города Москвы № 11





«15 июля» 2024 г.

ПЕРСониФИЦИРОВАННАЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА
НАСЛЕДСТВЕННОЙ И ВРОЖДЕННОЙ ПАТОЛОГИИ В
МНОГОПРОФИЛЬНОЙ ПЕДИАТРИЧЕСКОЙ КЛИНИКЕ

Методические рекомендации № 42

Москва 2024

УДК- 616-01/09

ББК- 5-52.5

С- П27

Организация-разработчик: Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Научно-практический центр специализированной медицинской помощи детям имени В.Ф. Войно-Ясенецкого Департамента здравоохранения города Москвы»; Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Составители: к. м. н., доцент Кожанова Т.В., к. м. н., доцент Жилина С.С., к. м. н. Мещерякова Т.И., Абрамов А.А.

Рецензенты:

Доцент кафедры общей и медицинской генетики МБФ, ФГАОУ ВО «РНИМУ имени Н.И. Пирогова» МЗ РФ к. м. н., доцент Наталья Владимировна Барышникова;

врач – детский эндокринолог медико-генетического отделения ГБУЗ «Морозовская ДГКБ ДЗМ» к. м. н. Марина Борисовна Конюхова.

Персонафицированная генетическая диагностика наследственной и врожденной патологии в многопрофильной педиатрической клинике: методические рекомендации // составители: Т.В. Кожанова, С.С. Жилина, Т.И. Мещерякова, А.А. Абрамов, А.Г. – М.: ГБУЗ «НПЦ спец. мед. помощи детям ДЗМ», 2024. – 37 с.

Предназначение: настоящее учебно-методическое пособие предназначено для врачей-генетиков, неврологов, педиатров, детских хирургов, онкологов, неонатологов, врачей других специальностей, а также для обучения ординаторов и студентов медицинских университетов.

Методические рекомендации разработаны в ходе выполнения научно-исследовательской работы Департамента здравоохранения г. Москвы № 123031700070-8 «Персонализированный подход к диагностике, лечению и профилактике инвалидизирующих заболеваний у детей с врожденной и приобретенной патологией в многопрофильной педиатрической клинике»

Данный документ является собственностью Департамента здравоохранения города Москвы и не подлежит тиражированию и распространению без соответствующего разрешения

ISBN

© Департамент здравоохранения города Москвы, 2024

© ГБУЗ «НПЦ спец. мед. помощи детям ДЗМ», 2024

© Коллектив авторов, 2024

СОДЕРЖАНИЕ

1. Нормативные ссылки.....	4.
2. Определения.....	5
3. Обозначения и сокращения.....	6
4. Введение.....	7
5. Основная часть.....	8
6. Заключение.....	30
7. Список использованных источников.....	32
8. Приложение 1.....	36
9. Приложение 2.....	37

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

1. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 21 апреля 2022 г. № 274н «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи пациентам с врожденными и (или) наследственными заболеваниями»

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящем документе применяют следующие термины с соответствующими определениями

Вариация числа копий – вид генетического полиморфизма, при котором происходит изменение числа копий определенного сегмента ДНК размером не менее 1000 п.н., по сравнению с репрезентативным референсным геномом.

Врожденный порок развития – стойкое морфологическое изменение органа или части тела, выходящее за пределы нормальной вариации их строения, приводящее к нарушению функции или являющееся косметическим дефектом.

Ген – структурная и функциональная единица наследственности живых организмов, представляет собой участок ДНК, определяющий последовательность полипептида или функциональной РНК.

Микроаномалия развития – это такой морфологический дефект, который не влияет на функцию органа.

Мутация (вариант нуклеотидной последовательности) – стойкое изменение в наследственном аппарате клетки (его структуры и функции), которое возникает под действием внешних или внутренних факторов.

Наследственные заболевания – заболевания, возникновение и развитие которых обусловлены дефектами в наследственном материале клеток, передаваемыми по наследству через гаметы.

Персонализированная медицина (ПМ) – совокупность методов профилактики, диагностики и лечения патологического состояния, которые основаны на индивидуальных особенностях пациента.

Секвенирование – определение нуклеотидной последовательности ДНК или РНК.

Синдромологический анализ – анализ всей совокупности фенотипических проявлений болезни с целью выявления устойчивого сочетания признаков, характерного для определенных врожденных и наследственных заболеваний.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ВПР – врожденные пороки развития
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
КТ – компьютерная томография
МАР – микроаномалии развития
МРТ – магнитно-резонансная томография
НБО – наследственные болезни обмена веществ
ПЭС – полноэкзомное секвенирование
ПГС – полногеномное секвенирование
ПЦР — полимеразная цепная реакция
УЗИ – ультразвуковое исследование
ХА – хромосомные аномалии
ХМА – хромосомный микроматричный анализ
ЦНС — центральная нервная система
ЭРиЭ – энцефалопатия развития и эпилептическая энцефалопатия
ACMG – American College of Medical Genetics and Genomics (Американская коллегия по медицинской генетике и геномике)
CGH – сравнительная геномная гибридизация
CNV – вариации числа копий участков дезоксирибонуклеиновой кислоты
FISH – флуоресцентная гибридизация in situ
NGS – секвенирование нового поколения
OMIM – Интернет-каталог генов и генетических заболеваний человека (Online Mendelian Inheritance in Man)

ВЕДЕНИЕ

Персонализированная (персонифицированная) медицина — новое направление медицины, которое представляет собой совокупность методов профилактики, диагностики и лечения патологического состояния, основанных на индивидуальных особенностях пациента (генетические, эпигенетические, транскриптомные, протеомные, метаболомные).

В основе персонализированной медицины первостепенным является подход к оценке состояния здоровья человека, тщательное изучение физиологических и генетических особенностей всего организма с использованием современных молекулярных и инструментальных методов обследования.

Улучшение прогноза заболевания, точности диагностики, а также повышение эффективности проводимой терапии достигается благодаря применению подходов персонализированной медицины в повседневной клинической практике. Стремительному развитию персонифицированной медицины способствовало внедрение в клиническую практику молекулярных и информационных технологий. Впервые концепция персонифицированной терапии стала применяться в онкологии (таргетная терапия при различных опухолях). В настоящее время ее внедрение расширилось до возможности точного предсказания развития большого количества заболеваний на основе полногеномного скрининга, вплоть до создания генно-терапевтических препаратов, технологий модификации экспрессии генов и мощной информационно-аналитической системы для поиска индивидуальных предикторов ответа на лекарственные препараты. В основе персонализированной медицины немаловажным является междисциплинарный подход, который включает использование знаний, полученных в области геномики, инновационной биоинформатики и передовых достижений, в клинической практике. Создание новых технологий в диагностике заболеваний на основе биомаркеров, разработка таргетных лекарственных препаратов, развитие фармакогенетики и фармакогеномики как новых направлений науки, технологий редактирования генома, модификации микробиоты, нутритивной геномики является основой для построения и применения персонализированного подхода в каждом пациенту в современной медицине.

Персонализированный подход в медицинской генетике требует проведения дополнительных высокотехнологичных генетических исследований. Использование персонифицированного подхода к каждому пациенту существенно сократит не только смертность от тяжелых заболеваний, но и использование низкоэффективных лекарственных препаратов, особенно в отношении онкологических, сердечно-сосудистых, неврологических и другим распространенных заболеваний.

Таким образом, основными подходами персонализированной медицины являются:

- предсказание на основе геномных данных вероятности возникновения заболевания с последующей разработкой профилактических мероприятий;
- переход от традиционной клинической диагностики к персонализированной с учетом индивидуальных показателей пациента;
- выбор тактики терапии с учетом индивидуальных показателей пациентов;
- фармакологические аспекты, включающие индивидуальный подбор лекарственных средств на основе геномных исследований с последующим лекарственным мониторингом.

В настоящее время полный переход к персонализированному здравоохранению является одним из приоритетных задач стратегического развития Российской Федерации до 2030 года «Стратегия научно-технологического развития РФ», поэтому применение в многопрофильной педиатрической клинике персонифицированного подхода к лечению и медицинской реабилитации позволит существенно улучшить

результаты лечения детей, больных инвалидизирующими заболеваниями, в т.ч. орфанными.

В настоящее время основные усилия направлены на разработку методов и подходов, позволяющих максимально полно интерпретировать полученную биологическую информацию и связывать ее с клиническими данными.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

ОСОБЕННОСТИ ОБСЛЕДОВАНИЯ БОЛЬНЫХ С ПОДОЗРЕНИЕМ НА НАСЛЕДСТВЕННОЕ И ВРОЖДЕННОЕ ЗАБОЛЕВАНИЕ

Консультирование семьи включает клиническое обследование с постановкой предварительного диагноза и определением показаний для проведения подтверждающей диагностики (поиск генетической причины заболевания).

Во время консультирования семьи врач-генетик у пробанда (пациент с заболеванием) в первую очередь тщательно собирает анамнез заболевания, анамнез жизни, составляет родословную и анализирует генеалогические данные, осматривает пациента с целью выявления малых аномалий и пороков развития. На основе полученной информации проводит фенотипический анализ и определяет показания для назначения генетических и клинических методов исследований (КТ, МРТ, УЗИ).

При синдромологическом анализе оправдано использование международных баз менделирующих и хромосомных синдромов.

Первичный прием у врача-генетика

Первичный прием врача-генетика должен включать сбор следующей информации у пробанда и членов его семьи (родители, сибсы, другие родственники не менее I и II степеней родства):

1. Предыдущие беременности и роды у матери, период новорожденности, тип вскармливания и раннее развитие пробанда.
2. В отношении течения беременности собираются данные о наличии инфекционных заболеваний во время беременности, приёма лекарственных препаратов, воздействия агрессивных факторов среды, наличии у супругов вредных привычек или профессиональной вредности.
3. Акушерский анамнез: наличие гестоза, угрозы прерывания беременности и в какие сроки, преждевременные роды, случаи мертворождения или рождения детей с малой или избыточной массой тела, врожденными пороками развития, хромосомными или моногенными заболеваниями.
4. Гинекологический анамнез: инфекции, передаваемые половым путем, хронические соматические заболевания неинфекционной природы, включая гестационный сахарный диабет и тромбофилию беременных.
5. Время дебюта и характер течения заболевания у пробанда.

Клинико-генеалогический анализ

При проведении клинико-генеалогического анализа следует обратить внимание на сходность клинических проявлений заболевания у пробанда, его родителей и других родственников. При фенотипическом анализе допускается использование семейных фотоальбомов, видеоматериалов и другой медицинской документации.

На основе полученной информации врач-генетик с использованием стандартных символов и их описания составляет родословную (см. Приложение 1). Составление родословной начинается с пробанда (отмечается стрелкой), который обычно располагается в последнем поколении родственников на схеме. Для проведения полноценного клинико-генеалогического анализа семейная родословная должна включать информацию о родственниках двух-трех поколений, и чем больше будет их обследовано, тем достовернее будут полученные выводы. Легенда – описание

существенных для анализа родословной сведений о членах родословной, которые нельзя отобразить графически, помещается под родословной.

Составление легенды к родословной:

1. Паспортная часть;
 - девичья фамилия матери (случаи родственных браков, одинаковые фамилии предков, проживающих в отдаленных населенных пунктах).
2. Возраст;
 - возраст первых клинических проявлений заболевания (приступов).
3. Пол.
4. Национальность.
5. Место жительства семьи.
6. Место жительства предков.
 - выявление кровнородственных браков в ограниченных отдалённых популяциях людей и этнических группах.
7. Профессия.
8. Наличие хронических заболеваний у родственников.

Анамнез жизни и заболевания чрезвычайно важны при диагностике наследственных заболеваний.

Анамнез должен собираться подробно, важно получить возможно более точные сведения о течении беременности и родов, периоде новорожденности, вскармливании и о раннем развитии пробанда (моторное и речевое развитие). Полученная информация позволит обнаружить тератогенное повреждение, в частности, диабетическую и алкогольную эмбриопатию, фетальный синдром краснухи и т.д. Необходимо сопоставление времени действия выявленного средового фактора с обнаруженным у ребенка симптомокомплексом. Нередко пренатальная гипоплазия является одним из основных признаков наследственного синдрома. При синдромах Дубовица, де Ланге, Смита-Лемли-Опица при доношенной беременности дети рождаются с резко выраженной пренатальной гипоплазией. Напротив, макросомия (средняя масса при рождении — 3900 г, а длина 55,2 см) в сочетании с макроглоссией и омфалоцеле характерна для синдрома Беквита-Видемана. Важны сведения о раннем психомоторном развитии ребенка. Потеря приобретенных навыков — **важный диагностический признак**, который характерен для нейродегенеративных заболеваний.

При анализе анамнеза заболевания учитывается **возраст манифестации**. При наследственных заболеваниях он может сильно варьировать. Необходимо отметить, что при рождении не все наследственные болезни проявляются в первые дни жизни. А также не все врожденные заболевания относятся к наследственным (например: изолированные пороки развития мозга и множественные врожденные пороки развития и врожденные пневмонии). То есть термины наследственный и врожденный не являются синонимами.

Хронический, и нередко **прогредиентный характер течения** наследственных заболеваний является отражением и следствием нарушения работы вследствие существующей мутации. Например, прогредиентное течение наблюдается при всех наследственных болезнях обмена, при нейродегенеративных заболеваниях (лейкодистрофии, подкорковые дегенерации).

Лечебные мероприятия при наследственной патологии являются трудным и в некоторых случаях неразрешимым вопросом. Но в то же время разработана тактика медицинского сопровождения и патогенетического лечения больных с доказанными формами редких (орфанных) заболеваний, таких как дефицит биотинидазы, X-сцепленная адренолейкодистрофия, мукополисахаридозы, аминокцидопатии и органические ацидурии.

Накопление в семье больных с одним заболеванием также является одной из характеристик наследственной патологии. В случае моногенных синдромов характер накопления (сегрегация) – по вертикали (у предков и потомков), по горизонтали (у сибсов родных и двоюродных), у лиц только мужского пола и т.д., – соответствует определенному типу наследования. При этом у части родственников в родословной могут присутствовать лишь отдельные симптомы заболевания, что отражает вариабельность экспрессивности генов.

Информация, полученная при анализе родословной, позволяет установить тип наследования заболевания или признака у пробанда: аутосомное (доминантное или рецессивное), X-сцепленное с полом (доминантный или рецессивное), полигенное либо митохондриальное наследование.

Критерии аутосомно-доминантного типа наследования:

1. Признак (болезнь) проявляется у гетерозигот;
2. Больные есть в каждом поколении;
3. Мужчины и женщины болеют одинаково часто;
4. Вероятность рождения больного ребенка у больного родителя – 50%;
5. У больных гетерозиготных родителей (Aa) могут быть здоровые дети (aa);
6. В браке гомозиготного больного (AA) со здоровым (aa) – все (100%) дети будут больны (Aa).

Критерии аутосомно-рецессивного типа наследования:

1. Больные дети рождаются у здоровых носителей патогенного варианта родителей;
2. Вероятность рождения больного ребенка у гетерозиготных носителей 25% (высокий генетический риск);
3. У здорового (AA) в браке с больным (aa) рождаются здоровые (Aa) гетерозиготные носители гена;
4. Мальчики и девочки болеют с одинаковой частотой;
5. У обоих больных родителей все дети будут больны.

Критерии доминантного сцепленного с X-хромосомой наследования:

1. Доминантный ген на X-хромосоме проявляется и у мужчин, и у женщин. У мужчин заболевание протекает тяжелее или плоды погибают внутриутробно;
2. При доминантном X-сцепленном типе наследования мужчина передает патологический ген всем дочерям и не передает сыновьям;
3. Мутантный ген от больной женщины передается потомству с вероятностью 50%;
4. Заболевание не передается от отца к сыну.

Критерии рецессивного сцепленного с X-хромосомой наследования:

1. Болеют чаще мальчики. У женщин может быть стертая форма заболевания;
2. Женщина-гетерозигота по рецессивному гену (носительница) может передать его с X-хромосомой 50% своих сыновей, которые будут больны, а 50% ее дочерей будут являться здоровыми носительницами;
3. От отца заболевание никогда не передается сыну, а все дочери будут носительницами.

Объективный врачебный осмотр

При изучении внешнего вида врач описывает фенотипические особенности (патологические признаки), которые он регистрирует у пробанда. Необходимым условием объективного врачебного осмотра для успешного распознавания заболевания является тщательное выявление фенотипических особенностей, морфологических и функциональных изменений органов и частей тела и динамики клинических изменений.

Внешний вид больных с некоторыми наследственными болезнями столь характерен, что делает больных более схожими друг с другом, чем с близкими родственниками (легко узнаваемый фенотип).

Наследственную патологию характеризует также **множественность, полисистемность поражения, что объясняется плейотропным действием гена**. При наследственных болезнях обмена – полисистемность и прогрессивность связана с накоплением и токсическим действием продуктов нарушенного метаболизма. Множественность поражения, являющаяся постоянным симптомом при хромосомных синдромах, обусловлена дисбалансом всего генома, вовлеченного в анеуплоидию или структурную хромосомную aberrацию. Минимальные диагностические признаки характерны для каждого хромосомного синдрома.

Разные системы организма с различной частотой вовлекаются в патологический процесс. Наиболее часто поражается развивающийся мозг ребенка

Генетически обусловленные заболевания отличают также особенности внешнего вида. Под **синдромологическим анализом** подразумевается анализ всех фенотипических проявлений с целью выявления устойчивого сочетания признаков, характерных для определенных врожденных и наследственных заболеваний.

Термин **врожденный порок развития** определяется как стойкое морфологическое изменение органа или части тела, выходящее за пределы нормальной вариации их строения и приводящее к нарушению функции или являющееся косметическим дефектом.

В отличие от порока развития **микроаномалия развития** — это такой морфологический дефект, который выходит за рамки нормального строения органа и не нарушает его функцию. Микроаномалии развития широко представлены во всех морфологических структурах человеческого тела, однако при диагностике наследственных болезней и синдромов преимущественно ориентируются на микроаномалии, регистрируемые при внешнем осмотре пробанда. Обнаружение микроаномалий развития и некоторые их сочетания у пациента позволяют заподозрить наследственный характер заболевания и обосновать необходимость молекулярно-генетического и/или молекулярно-цитогенетического обследования с целью поиска молекулярных причин.

Под **синдромом множественных пороков** понимают стойкое сочетание двух или более не индуцируемых друг другом пороков развития в разных органах и системах. Уникальное, описанное только у одного больного сочетание врожденных пороков развития относят к неклассифицированным комплексам пороков развития.

Для определения возможной генетической причины заболевания в своей практике врачи-генетики используют удобные и эффективные специализированные международные базы данных моногенных и хромосомных заболеваний, а также экспертные диагностические системы (Интернет-каталог менделирующих заболеваний человека В. Мак-Кьюсика (Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM); ORPHANET; мультимедийная информационно-справочная система «Врожденные пороки развития», а также другие доступные компьютерные базы данных для фенотипического анализа (Face2Gene, Phenomizer, FindZebra и другие). При диагностике наследственного заболевания данные осмотра сопоставляются с клинико-генеалогическими данными, врач вырабатывает тактику обследования и назначает в зависимости от показаний проведение современных цитогенетических, молекулярно-цитогенетических, молекулярно-генетических и биохимических методов подтверждающей диагностики.

Врач-генетик обязан соблюдать ряд профессиональных **требований и правил**:

1. Врач-генетик должен самостоятельно или коллегиально принимать решение о выборе методов генетического тестирования;

2. Только врач-генетик может поставить окончательный диагноз наследственного или врожденного заболевания;
3. При постановке диагноза врач-генетик должен сопоставить соответствие клинических и лабораторных данных (должна учитываться возможность лабораторной ошибки, для избегания которой необходимо повторное тестирование);
4. В случае планирования деторождения в семье необходимо проведение тестирования супругов на гетерозиготное носительство.

Врачами-генетиками проконсультировано **5529** пациентов (22,3% от выписанных пациентов) в отделениях ГБУЗ «НПЦ спец. мед. помощи детям ДЗМ» за 2017–2023 гг.

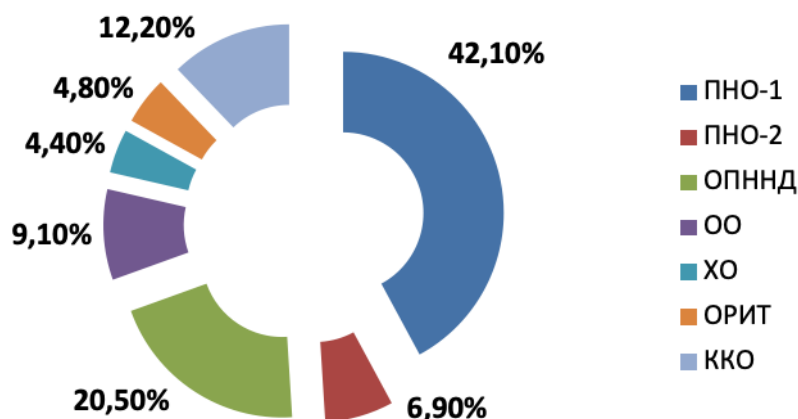


Рисунок 1. Доля пациентов, проконсультированных врачами-генетиками в отделениях ГБУЗ «НПЦ спец. мед. помощи детям ДЗМ» за 2017–2023 гг.

Примечание: ПНО – психоневрологическое отделение; ОПННД – отделение патологии новорожденных и недоношенных детей; ОО – онкологическое отделение; ХО – хирургическое отделение; ОРИТ – отделение реанимации и интенсивной терапии; ККО – клиничко-консультативное отделение.

Наиболее высокая потребность в консультациях врача-генетика в психоневрологических отделениях и отделении патологии новорожденных и недоношенных детей, клиничко-консультативном и онкологическом отделениях.

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ У ПАЦИЕНТОВ С ПОДОЗРЕНИЕМ НА НАСЛЕДСТВЕННОЕ И ВРОЖДЕННОЕ ЗАБОЛЕВАНИЕ

Для чего нужна точная генетическая диагностика:

1. Молекулярно-генетическое подтверждение клинического диагноза;
2. Определение прогноза течения заболевания для пациента;
3. Планирование деторождения в данной супружеской паре;
4. Оценка эффективности проводимой терапии;
5. Целесообразность планового хирургического лечения.

Для диагностики наследственных болезней обмена используются **методы аналитической биохимии**.

С их помощью могут определяться разные классы органических и неорганических соединений: аминокислоты, углеводы, липиды и их метаболиты, ионы металлов и др. В процессе их анализа определяется состав, концентрация структурных компонентов клеток и тканей, а также изменения активности ферментов. С целью проведения биохимического анализа используется любая биологическая ткань и жидкость

организма.

Постановка точного биохимического диагноза во многих случаях определяет тактику заместительной фармакотерапии.

Выделяют качественные, количественные и полуколичественные **методы аналитической биохимии**. Для определения избыточной концентрации субстратов заблокированных ферментных реакций или их производных, накапливающихся при НБО (например фенилаланин), используются качественные методы. Количественные и полуколичественные необходимы для определения концентрации веществ и нарушения кислотно-щелочного равновесия.

Стандартная двухэтапная система обследования больных – программа массового (тотального) и селективного (выборочного) скрининга разработана и внедрена в практику здравоохранения именно на этой основе.

Критерии для направления на селективный скрининг НБО:

- 1) смерть предыдущего ребенка в младенчестве от сходного заболевания;
- 2) внезапное ухудшение клинического состояния ребенка после нормальных родов и нормального послеродового периода (часы – недели), не поддающееся терапии и на фоне нормальных результатов рутинного параклинического и лабораторного обследования:
 - острая метаболическая энцефалопатия;
 - нарушение мышечного тонуса (гипотония/гипертонус);
 - летаргия/кома;
 - судороги, резистентные к антиэпилептической терапии;
 - дистонии, гиперкинезы;
 - частые срыгивания/рвота;
- 3) гепато/гепатоспленомегалия;
- 4) метаболический ацидоз;
- 5) множественные переломы.

Молекулярно-генетические и молекулярно-цитогенетические методы исследования в диагностике наследственных заболеваний

Идентификация новых генов и генетических вариантов нуклеотидной последовательности способствует пониманию механизмов болезни и синдромов.

В последние годы стали доступны новые молекулярно-генетических технологии, которые изменили подход к генетическому тестированию, позволяя расширить генетический анализ как спорадических, так и семейных случаев. Современные технологии включают: молекулярно-цитогенетический метод анализа вариаций числа копий ДНК (copy number variations – CNV) – молекулярное кариотипирование, сравнительная геномная гибридизация на чипах и секвенирование последующего поколения (next generation sequencing – NGS).

Цитогенетические методы исследования

С помощью цитогенетических методов в клинической генетике определяют число и нарушение структуры хромосом.

Стандартное (классическое) кариотипирование построено на анализе морфологии дифференциально окрашенных хромосом. Метод позволяет выявить основную долю всех аномалий кариотипа в пре- и постнатальной диагностике. Однако при анализе сложных случаев хромосомных перестроек, особенно возникших *de novo*, используются современные высокотехнологичные методы в изучении хромосомной патологии человека (FISH-метод, молекулярное кариотипирование (хромосомный микроматричный анализ – ХМА).

Метод FISH-диагностики при хромосомных заболеваниях – метод прямого выявления хромосомных микроперестроек непосредственно на цитологических

препаратах, позволяющий одновременно исследовать их морфологию (идентифицировать отдельные хромосомы и их участки) с помощью специфических ДНК-зондов. Данный метод позволяет идентифицировать точки разрыва на хромосомах и выявить сбалансированные транслокации.

Хромосомный микроматричный анализ

Внедрение технологии ХМА способствовало открытию ранее неизвестных микроделеционных и микродупликационных синдромов.

Развитие технологии ХМА позволяет врачам оценить весь геном путем анализа вариаций числа копий ДНК (дупликации, делеции) в одном тесте. Высокое разрешение этого метода, однако, ограничивается трудностью определения сбалансированных хромосомных транслокаций или инверсий.

Показания к назначению хромосомного микроматричного анализа в диагностике наследственной эпилепсии:

1. Врожденные пороки развития;
2. Недифференцированный интеллектуальный дефицит;
3. Расстройства аутистического спектра;
4. Задержка психомоторного и речевого развития;
5. Малые аномалии развития.

Ограничения метода хромосомного микроматричного анализа (что нельзя обнаружить):

1. Сбалансированные хромосомные перестройки (транслокации, инверсии);
2. Точковые варианты нуклеотидной последовательности;
3. Экспансии тринуклеотидных повторов;
4. Микроделеции/микродупликации, размер которых меньше разрешающей способности микроматрицы (как правило, выявляются нарушения размером не менее 50 тыс. пар нуклеотидов, в отдельных локусах не менее 10 тыс. пар нуклеотидов).

Определение клинической значимости выявленных вариаций числа копий ДНК методом ХМА с использованием баз данных и трактовка результатов исследований

1. Трактовке подлежат результаты исследований, прошедших тщательный биоинформатический анализ;
2. Врачу необходимо сопоставить выявленные изменения в геноме с клинической картиной заболевания у пробанда. При необходимости должны быть назначены дополнительные исследования.

Интерпретация данных хромосомного микроматричного анализа проводится согласно рекомендациям ACMG (Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: revision 2013; American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants).

1. Патогенные CNV описаны во многих рецензируемых журналах, базах данных и научной медицинской литературе как причина заболевания с четко установленной клинической значимостью.

2. CNV с неопределенной клинической значимостью включают варианты, которые позже будут описаны либо как патогенные, либо как доброкачественные.

3. Доброкачественные CNV описаны во многих рецензируемых журналах или базах данных как доброкачественные, особенно если вариант был хорошо охарактеризован и/или представляет собой частый полиморфизм. CNV квалифицируется как полиморфизм, если частота в общей популяции более 1%.

Базы данных, которые используются для интерпретации полученных результатов молекулярного кариотипирования: OMIM, ISCA, DECIPHER, GeneReviews, Database of genomic variants, PubMed, ClinVar. DGV, gnomAD.

Молекулярно-генетическая диагностика некоторых синдромов возможна только при использовании определенных методик: так, диагностика **синдрома Ангельмана** основана на существенном различии метилирования некоторых генов на отцовской и материнской хромосоме (анализ аллельного метилирования методом метил-специфической ПЦР), а для диагностики **синдрома Мартина-Белл** используют определение аномального метилирования методом метилчувствительной ПЦР промоторной области гена *FMRI*.

Секвенирование последующего поколения (массовое параллельное секвенирование) – next generation sequencing – NGS

Высокопроизводительное секвенирование представляет собой мощный инструмент для изучения наследственных заболеваний. Преимуществом, но одновременно и трудностью данной методики является генерация избыточного количества информации, которую необходимо интерпретировать в соответствии с клиническими данными. В основе массового параллельного секвенирования лежит прочтение нуклеотидной последовательности ДНК и РНК для определения их первичной структуры. Главное отличие от более ранних методов секвенирования заключается в возможности прочтения одновременно всего генома. Таким образом, в ходе исследования могут генерироваться от сотен миллионов до миллиардов нуклеотидных последовательностей за один рабочий цикл.

В настоящее время для проведения массового параллельного секвенирования доступны следующие платформы: HiSeq, MiSeq и NextSeq 500 (Illumina), Ion torrent (Thermo Fisher Scientific) и SOLiD (Applied Biosystems). В самых общих чертах эти платформы работают по аналогичному процессу, который включает: (а) подготовку мишени путем разбивания больших макромолекулы ДНК, чтобы создать библиотеку из коротких фрагментов с синтетическими ДНК-адаптерами на концах фрагмента, (б) массивную и параллельную клональную амплификацию индивидуальных фрагментов молекул ДНК на предметном стекле или микрошариках с помощью ПЦР, чтобы генерировать достаточное количество копий меченого фрагмента, которое нужно будет определить оптической системой машины, и (в) секвенирование при помощи нескольких циклов, которые повторяются и определяются автоматически, чтобы создать короткие прочтения. Данные этих прочтений затем собираются с помощью устройства, выравниваются с помощью специального программного обеспечения, что позволяет восстановить исходную последовательность мишени.

Полное секвенирование экзона

Секвенирование экзона (Exome sequencing) – секвенирование всех кодирующих белки участков генов (экзонов). Экзом (180 000 экзонов или приблизительно 30 млн пар оснований) составляет около 1,5% генома человека, и варианты в нем имеют гораздо больше шансов вызывать серьезные последствия, чем в остальных 99%.

Преимущества обследования методом полноэкзомного секвенирования:

1. Выявление новых редких вариантов;
2. Описание новых синдромов.

Ограничения метода (что нельзя обнаружить):

1. Варианты, приводящие к изменению числа копий генов;
2. Экспансию тринуклеотидных повторов;
3. Варианты в генах митохондриального генома;
4. Однородительские дисомии;
5. Различить варианты в гене и псевдогене (например, при спинальной

амиотрофии);

6. Делеции и дупликации размером от 40 п.н. до 20 т.п.н.

Определение клинической значимости выявленных вариантов нуклеотидной последовательности ДНК методом NGS с использованием баз данных и трактовка результатов исследований

1. Трактовке подлежат результаты исследований, прошедших тщательный биоинформатический анализ;
2. Врачу необходимо сопоставить выявленные изменения в геноме с клинической картиной заболевания у пробанда. При необходимости должны быть назначены дополнительные исследования;
3. Проверить наличие выявленных генетических вариантов у пробанда и его родителей (сегрегационный анализ) секвенированием по Сэнгеру.

Интерпретация данных, полученных методом NGS, проводится согласно международным и российским рекомендациям – Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology; Guidelines for diagnostic next-generation sequencing; Standards and Guidelines for Validating Next-Generation Sequencing Bioinformatics Pipelines; Российское руководство по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS)).

Выявленные варианты классифицируются на 6 классов на основании стандартов и рекомендаций ACMG:

Класс 1 – патогенные

Класс 2 – вероятно патогенные

Класс 3 – варианты с неопределенной клинической значимостью

Класс 4 – вероятно доброкачественные

Класс 5 – доброкачественные

Класс 6 – варианты, ассоциированные с заболеванием.

Базы данных, используемые для интерпретации результатов NGS:

1. Базы данных болезней и клинической значимости вариантов: OMIM, ClinVar, Orphanet, а также специализированные базы данных по отдельным заболеваниям и литературные данные;
2. Сервисы предсказания патогенности: CADD, Polyphen, LRT, Provean, Meta SVM, Meta LR, M-CAP, Primate AI, FAtHMM-MKL, SpliceAI, PhyloP, AlphaMissense;
3. База данных популяционных частот выявленных вариантов – Genome Aggregation Database (gnomAD v4, более 807 000 человек).

Все варианты нуклеотидной последовательности ДНК, выявленные методом массового параллельного секвенирования, должны быть подтверждены референсным методом (секвенирование по Сэнгеру, ХМА), а также должен быть проведен сегрегационный анализ – исследовано их происхождение (унаследована от родителей или возникли *de novo*).

Проведение генетической диагностики является важным этапом медико-генетического консультирования пробанда и членов его семьи.

В ДНК-исследовании нуждаются около 85% пациентов от всех проконсультированных. В генетической лаборатории ГБУЗ «НПЦ спец. мед. помощи детям ДЗМ» за 2017–2023 гг. проведено:

1. Исследований кариотипа (до 2020 г.) – 463 пациента;
2. Секвенирование панели генов и экзона – 331 пациент;
3. Секвенирование гена *SCN1A* – 184 пациента;
4. Поиск мутаций в гене *PHOX2B* – 39 пациентов;

5. Поиск мутаций в генах *FGFR1,2,3* – 57 пациентов (методика внедрена с 2018 г.);
6. Секвенирование гена *SLC2A1* – 55 пациентов;
7. Секвенирование *RP65* – 2 пациента (методика внедрена с 2021 г.);
8. Анализ аллельного метилирования – 27 пациентов (методика внедрена с 2021 г.).

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА *SCN1A*-АССОЦИИРОВАННЫХ ЭПИЛЕПСИЙ

Варианты нуклеотидной последовательности в генах *SCN1A* ассоциированы с развитием генерализованной эпилепсии с фебрильными судорогами плюс (ОМIM: #604233) и энцефалопатией развития и эпилептической энцефалопатией 6В, синдром Драве (ОМIM: #619317; ОМIM: #607208). Варианты в гене *SCN1A* встречаются в 10–20% случаев генерализованной эпилепсии с фебрильными судорогами плюс и 80–90% случаев синдрома Драве.

К детским эпилептическим энцефалопатиям, ассоциированным с вариантами в гене *SCN1A*, также относится криптогенная фокальная и генерализованная эпилепсия, синдром Дузе (миоклонически-астатическая эпилепсия), синдром Леннокса-Гасто и вакцин-ассоциированная энцефалопатия.

Синдром Драве – тяжелая миоклоническая эпилептическая энцефалопатия. Синдром Драве характеризуется дебютом на первом году жизни и проявляется фебрильными, афебрильными генерализованными и фокальными судорогами, миоклониями, задержкой психического развития и резистентностью к противэпилептической терапии. Впервые была описана Ch. Dravet в 1978 году как тяжелая миоклоническая эпилепсия младенчества. Распространенность – 1:20000–1:40000 населения; аутосомно-доминантное наследование с неполной пенетрантностью (70-80%). По крайней мере 25% пациентов с синдромом Драве имеют отягощенный семейный анамнез в отношении эпилепсии или фебрильных судорог. Данное заболевание характеризуется появлением приступов на первом году жизни; провоцирующие факторы – закрытие глаз или прерывистая фотостимуляция; задержкой психомоторного развития со 2 года жизни; наличием генерализованных или парциальных фебрильных судорог, которые развиваются вслед за афебрильными судорогами, включая миоклонические, абсансные, тонико-клонические и парциальные приступы. В 95% случаев при синдроме Драве обнаруживаются *de novo* варианты в гене *SCN1A*.

Генерализованная эпилепсия с фебрильными судорогами плюс – наследуется по аутосомно-доминантному типу с неполной пенетрантностью. Известная причина развития заболевания — варианты в генах *SCN1A*, *SCN2A*, *SCN1B*, *GABRG2*. Дебют в первые годы жизни ребенка: от 4 месяцев до 6 лет. Характеризуется продолжительными тонико-клоническими судорогами, при этом приступы могут возникать на фоне повышения температуры тела. В некоторых случаях возможно сочетание с миоклониями, абсансами и фокальными приступами. По мере взросления ребенка судороги прекращаются самостоятельно. Средний возраст ремиссии составляет 10–11 лет. Заболевание протекает относительно легко и характеризуется благоприятным прогнозом, так как при данной форме заболевания не страдает интеллект и психомоторное развитие.

Ген *SCN1A* кодирует $\alpha 1$ субъединицу нейронального потенциалзависимого натриевого канала (ОМIM: 182389). Ген *SCN1A* локализуется на длинном плече хромосомы 2 (2q24.3) и включает 29 экзонов (размер белок-кодирующего региона – 6030 пар нуклеотидов). Все описанные к настоящему времени варианты нуклеотидной

последовательности в гене *SCN1A* (более 1000 вариантов) распределены равномерно по всем экзонам (рис. 2).

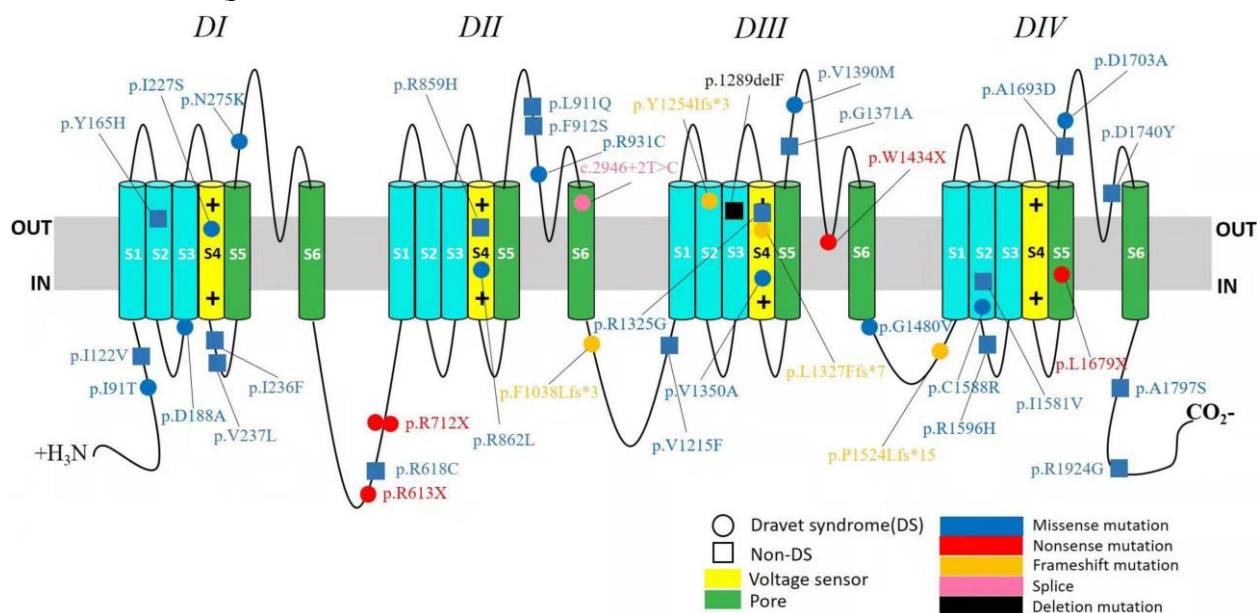


Рисунок 2. Локализация вариантов в гене *SCN1A* и структура $\alpha 1$ субъединицы канала

Прямое секвенирование отдельных экзонов гена *SCN1A* используют для подтверждения *SCN1A*-ассоциированных эпилепсий.

Клинические и диагностические критерии для направления на молекулярно-генетическое исследование с целью поиска вариантов в гене *SCN1A*:

1. Дебют фебрильных генерализованных и фокальных приступов с наличием миоклоний на 1 году жизни;
2. Характерна высокая частота приступов, их серийность и склонность к статусному течению;
3. Провоцирующие факторы возникновения приступов – лихорадка, внешнее перегревание (горячая ванна, интенсивная физическая нагрузка, высокая температура окружающей среды);
4. Неврологическое обследование выявляет нарушения у большинства пациентов: мышечная гипотония, атаксия, интенционный тремор, моторная неловкость, признаки пирамидной недостаточности. Облигатный признак заболевания – присоединение (обычно после 4 лет) неэпилептического миоклонуса, усиливающегося при выполнении произвольных движений, который с возрастом нарастает;
5. Задержка психического и речевого развития разной степени выраженности;
6. Характерная особенность ЭЭГ в межприступном периоде – сочетание региональной, мультирегиональной и диффузной эпилептиформной активности с нарастанием во сне.

С 2017–2023 гг. в ГБУЗ «НПЦ спец. мед. помощи детям ДЗМ» проведено секвенирование гена *SCN1A* у 184 пациентов. Варианты выявлены у 26 пациентов (14,1%): с.1034G>A (8 экзон), с.1178G>A (9 экзон), с.215T>C (4 экзон), с.2345C>T (13 экзон), с.2678G>A (15 экзон), с.2875T>C (18 экзон), с.3036C>T (16 экзон), с.3700C>T (22 экзон), с.3952C>T (23 экзон), с.3970-1G>A (23 интрон), с.4354T>C (23 экзон),

с.479С>А (4 экзон), с.664С>Т (5 экзон), с.3700С>Т (22 экзон), с.3970-1G>А (23 интрон). При обнаружении у больного патогенного варианта в гене *SCN1A* с целью определения его происхождения проводится обследование родителей.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА СИНДРОМА ДЕФИЦИТА ТРАНСПОРТЕРА ГЛЮКОЗЫ ПЕРВОГО ТИПА (БОЛЕЗНЬ ДЕ ВИВО; ОМІМ # 606777)

Синдром дефицита транспортера глюкозы тип 1, болезнь де Виво (GLUT1 deficiency syndrome, ОМІМ #606777), – ранняя тяжелая эпилептическая энцефалопатия, характеризующаяся развитием резистентности к противоэпилептическим препаратам, формирующейся микроцефалией, задержкой психомоторного развития со спастичностью, атаксией, дизартрией и альтернирующей гемиплегией.

Известно, что для проникновения глюкозы через тканевые барьеры необходимы особые белки-переносчики. Два основных семейства транспортеров глюкозы были открыты в 1952 году Widdas et al.

Группа белков GLUT, которые облегчают пассивную диффузию глюкозы через тканевые барьеры с помощью энергонезависимых механизмов, является большим семейством белков-переносчиков глюкозы. Данная группа включает в себя 12 белков. GLUT1 экспрессируется в эндотелиальных клетках сосудов, входящих в состав гематоэнцефалического барьера, и отвечает за проникновение глюкозы в головной мозг, GLUT2 ассоциирован с синдромом Фанкони – Бикель, GLUT3 обеспечивает проникновение глюкозы через мембрану нейрональной плазмы, GLUT4 – инсулин-регулирующий транспортер глюкозы жировой ткани, сердечной мышцы и скелетных мышц, GLUT5 экспрессируется в кишечнике, тестикулах и почках.

В настоящее время описано более 100 пациентов с синдромом дефицита транспортера глюкозы тип 1.

Болезнь де Виво проявляется двумя клиническими формами:

1. **Классическая форма** (90% больных). Характеризуется задержкой психомоторного и речевого развития, дизартрией, микроцефалией и двигательными расстройствами (атаксия, дистония и хорей). В 70% случаев судороги начинаются в возрасте от 1 до 6 месяцев, у 90% пациентов в возрасте до 2 лет и в 10% случаев – старше 2 лет.
2. **Неэпилептическая форма** (10–15% больных). У пациентов более мягкий фенотип, в большей части с отсутствием судорог, преимущественно с двигательными нарушениями – пароксизмальными дискинезиями, перемежающейся атаксией, хореоатетозом, дистонией, альтернирующей гемиплегией и задержкой развития речи.

Клинические симптомы синдрома дефицита транспортера глюкозы провоцируются голодом или увеличением промежутков между приемами пищи с некоторым улучшением состояния после еды.

Судорожный синдром. При ранней классической форме приступы начинаются в возрасте 1–6 месяцев. Началу судорог у некоторых пациентов предшествуют эпизоды апноэ и аномальные движения глазных яблок, а также абсансы и атонические приступы. На ЭЭГ выявляются мультифокальные спайк-разряды. Типов судорог, которые развиваются при классической форме заболевания, – генерализованные тонические или клонические, фокальные, миоклонические, атипичные абсансы и атонические.

Нарушение интеллектуального развития. Задержка развития речи, снижение обучаемости наблюдается у всех пациентов. При этом они хорошо приспосабливаются к обществу и контактируют с другими людьми.

Двигательные расстройства. Нарушения могут быть постоянными или пароксизмальными и представлены атаксией, дистонией и хореей. Увеличение промежутков между приемами пищи, различные психотравмирующие ситуации или инфекции являются основными провоцирующими факторами.

Патогенные варианты гена *SLC2A1* являются причиной развития синдрома дефицита транспортера глюкозы. Ген *SLC2A1* состоит из 10 экзонов и локализуется на коротком плече хромосомы 1 (1p34.2). Ген *SLC2A1* кодирует белок GLUT1. В настоящее время в мире описано более 200 вариантов в гене *SLC2A1*, которые представлены различными типами мутаций – миссенс-мутации, нонсенс-мутации, внутригенные делеции и инсерции, а также варианты сайта сплайсинга (табл. 1). В большинстве случаев заболевание ассоциировано с вариантами в гене *SLC2A1*, возникшими *de novo*, однако описаны и семейные случаи.

Таблица 1. Различные типы патогенных вариантов в гене *SLC2A1* и частота их выявления

Ген	Метод исследования	Количество пациентов с патогенными вариантами
<i>SLC2A1</i>	Секвенирование гена	48/54 (89%)
	Анализ делеций/дупликаций	6/54 (11%)

Клинические и диагностические критерии для направления на секвенирование гена *SLC2A1*:

1. Дебют судорог от 1 до 6 месяцев;
2. Задержка психомоторного и речевого развития, дизартрия;
3. Приобретенная у большинства пациентов микроцефалия;
4. Атаксия, альтернирующая гемиплегия, гиперкинезы по типу дистонии и хорей, которые нарастают постепенно;
5. Обращает на себя внимание нарастание симптоматики при физической нагрузке, голоде или увеличении промежутков между приемами пищи;
6. При исследовании спинномозговой жидкости определяется низкая концентрация глюкозы при нормальных показателях ее в крови.

С 2017–2023 гг. в ГБУЗ «НПЦ спец. мед. помощи детям ДЗМ» проведено секвенирование гена *SLC2A1* у 55 пациентов. Варианты выявлены у 10 пациентов (18,2%): с.1088G>A (9 экзон), с.1223G>C (9 экзон), с.635G>A (5 экзон), с.650A>T (5 экзон), с.680-12 C>A (5 интрон), с.667C>T (5 экзон), с.902C>T (7 экзон), с.913C>T (7 экзон), с.143G>A (3 экзон), с.114+2T>C (1 интрон).

Высокоэффективным методом лечения для уменьшения проявления клинических симптомов синдрома дефицита транспортера глюкозы 1 типа (в первую очередь, судорожного синдрома и двигательных расстройств) является применение кетогенной диеты. Посредством особого белка – транспортера кетоновые тела также могут проникать через гематоэнцефалический барьер и, таким образом, обеспечивать головной мозг необходимым количеством энергии для метаболизма. Пациенты, как правило, хорошо переносят кетогенную диету. При введении кетогенной диеты в раннем возрасте прогноз у пациентов с данным заболеванием благоприятный.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА КРАНИОФАЦИАЛЬНЫХ СИНДРОМОВ

Варианты нуклеотидной последовательности в генах рецепторов фактора роста фибробластов, участвующих в развитии костной и хрящевой ткани, ассоциированы с развитием краниофациальных аномалий. В настоящее время описано более 500 синдромов, где одним из фенотипических проявлений являются пороки черепа и лица.

Одним из известных пороков является преждевременное закрытие одного или нескольких швов черепа – краниосиностоз. Выделяют изолированные краниосиностозы, при которых преждевременно закрывается один шов, и множественные – вовлекаются несколько швов. Явление пансиностоза характеризуется срастанием всех швов черепа. Клинический диагноз краниосиностоза может быть установлен на основании визуального осмотра, антропометрических и рентгенологических данных. Тип краниосиностоза определяет аномальная форма черепа (тригоноцефалия, скафоцефалия, плагиоцефалия, брахицефалия).

Распространенность краниосиностоза – 1 на 2250 новорожденных. Данный тип краниофациальной аномалии встречается во всех этнических группах. На долю спорадических случаев приходится приблизительно 92%. Выделяют несиндромальные и синдромальные формы краниосиностоза. Около 90% случаев представлены несиндромальными формами краниосиностоза. По данным научной литературы, частота возникновения синдромальных краниосиностозов может достигать 15–20%.

Синдромальные краниосиностозы объединяют группу дискраний, при которых различные пороки развития и оссификации костей лицевого и мозгового черепа сочетаются с пороками других органов, тканей и систем. Интернет-каталог генов и заболеваний человека включает более 200 синдромов с краниосиностозом (синдром Апера, синдром Крузона, синдром Мюнке, синдром Пфайффера, тригоноцефалия Опица синдром Сетре-Чотцена, синдром Джексона-Вейса, синдром Карпентера и т.д.) (рис. 3). Среди генетических причин развития краниосиностозов наиболее часто выявляются варианты нуклеотидных последовательностей в генах *FGFR2* (32% случаев), *FGFR3* (25% случаев), *TWIST1* (19% случаев), *EFNB* (7% случаев), *TCF12* и *ERF* (от 2-5% случаев).



Рисунок 3. Пациенты с синдромальными формами краниосиностоза

В генетической лаборатории ГБУЗ «НПЦ спец. Мед. помощи детям ДЗМ» в 2018 году внедрена диагностика методом секвенирования генов *FGFR1*, *FGFR2* и *FGFR3*. За 2017–2023 гг. обследовано 57 пациентов. Варианты выявлены у 12 (21,1%) пациентов: в гене *FGFR2* (синдромы Крузона, Апера и Пфайффера) – с.758C>G , 7 экзон; с.1024T>G , 7 экзон; с.868T>C, 7 экзон; с.833G>T, 7 экзон; с.779C>T, 7 экзон; с.1127A>G , 9 экзон; с.755C>G , 7 экзон; у 7 (12,3%) пациентов в гене *FGFR3* – с.1138G>A, 9 экзон (ахондроплазия); с.1172C>A , 9 экзон (синдром Крузон); с.742C>T , 7 экзон (ахондроплазия).

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА СИНДРОМА ВРОЖДЕННОЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ ГИПОВЕНТИЛЯЦИИ (ОМIM # 209880)

В структуру ГБУЗ «НПЦ спец. Мед. помощи детям ДЗМ» входит отделение реанимации и интенсивной терапии, где пациенты также нуждаются в консультации врачей-генетиков. Одной из тяжелых патологий, с которой пациенты поступают в отделение ОРИТ, является синдром врожденной центральной гиповентиляции, заболевание, характеризующееся недостаточным дыханием (гиповентиляцией), причина которого кроется в нарушении передачи импульсов, приводящих в движение дыхательную мускулатуру (диафрагму и мускулатуру грудной клетки) от головного мозга к дыхательной мускулатуре. В большинстве случаев синдром проявляется уже на первом месяце жизни, часто в первые часы после рождения, в виде апноэ во время сна.

При данном заболевании идентифицируется особый тип варианта в гене *RHOX2B*, который расположен на хромосоме 4. В 5–10% случаев родители являются носителями этой генетической аномалии. Ген *RHOX2B* отвечает за развитие тканей головного мозга в раннем эмбриональном периоде, до 8 недели беременности. На одном участке этого гена расположен регион, кодирующий в белке цепочку из 20 одинаковых аминокислот (аланин). В результате изменения количества тринуклеотидных повторов в гене синтезируется измененный белок, содержащий от 25 до 33 аланинов (полиаланиновая экспансия) (рис. 4). Для данного синдрома характерен феномен антиципации – увеличение тяжести течения болезни по мере роста числа копий повторов.

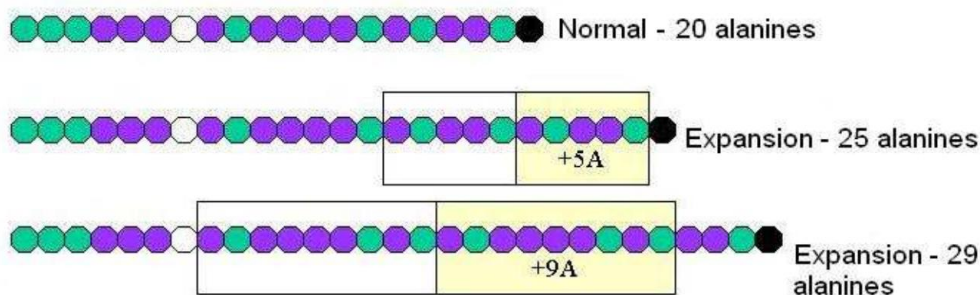


Рисунок 4. Различие между нормальным и мутированным геном *RHOX2B*

Персонализированный подход в ведении таких пациентов заключается в подтверждении диагноза выявлением патогенного варианта нуклеотидной последовательности в гене *RHOX2B* и подборе индивидуальных параметров постоянной респираторной поддержки. В ГБУЗ «НПЦ спец. мед. помощи детям ДЗМ» поиск вариантов в гене *RHOX2B* проводится с 2017 года – обследовано за данный период 39 пациентов. У 5 (12,8%) пациентов обнаружено увеличение числа тринуклеотидных повторов в 3 экзоне гена *RHOX2B* – выявлены следующие генотипы – 20/25, 20/26, 20/27.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА СИНДРОМОВ АНГЕЛЬМАНА И ПРАДЕРА-ВИЛЛИ

В клиническую практику ГБУЗ «НПЦ спец. мед. помощи детям ДЗМ» в 2021 г. внедрен метод анализа аллельного метилирования промоторной области гена *SNRPN* методом метилспецифической ПЦР.

У 70–75% больных причиной возникновения синдрома Прадера-Вилли и синдрома Ангельмана является протяженная делеция локуса хромосомы 15 (q11-q13). Делеция хромосомы 15(q11-q13) при синдроме Прадера-Вилли отцовского происхождения, а

при синдроме Ангельмана – материнского. Второй причиной возникновения синдрома Прадера-Вилли и синдрома Ангельмана является однородительская дисомия, т.е. наследование обоих гомологов хромосомы 15 от одного из родителей. Регион хромосомы 15(q11-q13) при синдроме Прадера-Вилли активен на отцовской хромосоме и не активен на материнской. Материнская однородительская дисомия наблюдается в 25% случаев синдрома Прадера-Вилли, а отцовская однородительская дисомия становится причиной возникновения синдрома Ангельмана в 3–5% случаев. Более редкой причиной развития этих синдромов являются специфические изменения в импринтированных генах (*SNRPN* и *UBE3A*), которые существенно различаются по характеру метилирования на отцовской и материнской хромосомах. Анализ аллельного метилирования любого из этих локусов лежит в основе диагностического теста для синдрома Прадера-Вилли и синдрома Ангельмана. В настоящее время обследовано 27 пациентов с подозрением на синдромы Прадера-Вилли и Ангельмана, в одном случае синдром Прадера-Вилли подтвержден.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА В ДЕТСКОЙ ОНКОЛОГИИ

С 2022 г. в генетической лаборатории ГБУЗ «НПЦ спец. мед. помощи детям ДЗМ» проводится молекулярно-генетическая диагностика опухолевых заболеваний почек (нефробластома) – прямое секвенирование всех кодирующих регионов (экзонов) гена *WT1*.

Нефробластома (опухоль Вильмса) в структуре злокачественных опухолей занимает 4-е место после гемобластозов, первичных опухолей центральной нервной системы и сарком мягких тканей. Частота встречаемости в Российской Федерации – от 0,4 до 1 на 100 000 детей. Чаще всего опухоль Вильмса возникает у детей в возрасте 2–5 лет, редко у новорожденных и еще реже у детей старше 8 лет. В 2% случаев возникновение опухоли Вильмса носит наследственный характер. Наряду с односторонним поражением почек в 5–10% всех случаев злокачественных опухолей почек у детей регистрируется двусторонняя нефробластома. Таким образом, билатеральная нефробластома (БН) – редкое заболевание в структуре опухолей у детей. БН относят к наследственным формам опухолей. Тип наследования – аутосомно-доминантный с неполной пенетрантностью и экспрессивностью. Семейные формы БН встречаются редко. Частота семейных форм среди больных с БН составляет 6,9%.

Опухоль Вильмса возникает из эмбриональной ткани почек, содержит клетки-предшественники почек и начинает развиваться в период внутриутробного развития организма. Опухоль Вильмса может включать и другие типы тканей (соединительная ткань, мышечная, хрящевая и эпителиальная). В связи с этим нефробластома также называют «смешанной опухолью».

С развитием опухоли Вильмса напрямую связаны мутации в гене *WT1*. Ген *WT1* кодирует фактор транскрипции, который необходим для нормального развития мочеполовой системы и мезотелиальных тканей. *WT1* жизненно важен для выживания и пролиферации мезенхимальных клеток, поскольку регулирует транскрипцию фактора роста фибробластов и костного морфогенетического белка. Во время нормального развития почек уровни экспрессии *WT1* низкие в недифференцированных мезенхимальных клетках и увеличиваются по мере того, как эти клетки конденсируются вокруг зачатка мочеточника. Варианты в гене *WT1* приводят к дезорганизации нефрогенных структур и закладывают основу для образования опухоли.

У детей с наследственной предрасположенностью к онкологическому заболеванию – так называемые наследственные опухолевые синдромы – может появиться опухоль

Вильмса односторонняя или билатеральная и/или нефробластоматоз. Нарушения в работе почек или вообще хроническая болезнь почек очень рано могут появиться у детей с некоторыми наследственными синдромами (например, синдром Дэниса Драша).

Поэтому для детей с одним из заболеваний или аномалией в развитии почек, у которых есть повышенная предрасположенность к появлению опухоли Вильмса, билатеральной нефробластоме, рекомендуется выполнить молекулярно-генетическое исследование и проконсультироваться у врача-генетика.

В лаборатории проводятся исследования, позволяющие повысить эффективность лечения пациентов со злокачественными новообразованиями. В настоящее время проводятся исследования уровней экспрессии микроРНК в образцах ткани и крови с целью мониторинга течения заболевания и оценки риска злокачественной трансформации. МикроРНК – малые, одноцепочечные некодирующие РНК (18–24 нуклеотидов), которые регулируют экспрессию генов на посттранскрипционном уровне. МикроРНК влияют на образование белка блокированием трансляции мРНК и стимуляцией ее деградации. В геноме от 10 до 20 ядерных генов регулируют работу одной микроРНК.

Малые некодирующие РНК, включая микроРНК, длинные некодирующие и кольцевые РНК, играют ключевую роль в прогрессировании **остеосаркомы**, злокачественной опухоли кости, которая возникает из мезенхимы и в основном поражает молодых людей и подростков. Особенно важно разрабатывать новые подходы к терапии остеосаркомы в связи с тем, что 5-летняя выживаемость составляет всего 28%. Так, установлено, что у большинства некодирующих РНК изменяется экспрессия, что в свою очередь приводит к изменению химиочувствительности при остеосаркоме. По данным научной литературы, циркулирующие микроРНК рассматриваются как прогностические биомаркеры различных типов рака. МикроРНК функционируют как онкогены, так и как супрессоры опухолей при остеосаркоме и влияют на фенотипические характеристики клеток посредством регуляции их генов-мишеней. Так, показано, что экспрессия МикроРНК-143 снижается в тканях и клетках остеосаркомы, при этом низкий уровень экспрессии микроРНК-143 ускоряет клеточную пролиферацию, миграцию и инвазию. Экспрессия микроРНК-130b повышается в тканях остеосаркомы и коррелирует с ее прогрессированием. Высокая экспрессия микроРНК-181a и микроРНК-27a определяется у пациентов с метастазами. Высокий уровень экспрессии микроРНК-21 в сыворотке крови является прогностическим маркером резистентности к химиотерапии и выживаемости.

Оценка уровней экспрессии микроРНК в плазме крови у пациентов с остеосаркомой позволяет дифференцировать их на разные группы по степени агрессивности, риску метастазирования и рецидива, а также дает возможность спрогнозировать развитие резистентности к химиотерапии.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ МАССОВОГО ПАРАЛЛЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

В настоящее время массовое параллельное секвенирование (NGS), позволяющее определить нуклеотидную последовательность ДНК и РНК за счет прочтения одновременно сразу нескольких участков генома, активно внедрено и используется в клинической практике, особенно в области медико-генетического консультирования.

Возможности использования технологии NGS широки и предполагают применение в поиске генетической причины заболевания кастомных генных панелей под определенную группу заболевания (например, наследственные нервно-мышечные заболевания), секвенирование всех генов ДНК (экзома) – ПЭС и секвенирование всего генома – ПГС. Благодаря применению целевых панелей генов возможно проводить

фенотип-генотипические корреляции. ПЭС – методика, которая позволяет отсекавировать только белок-кодирующие регионы генома (приблизительно 30 000 генов). Использование в клинической практике ПЭС позволяет получить диагностический выход у 85% пациентов (найти причину заболевания). В последнее годы произошел переход к применению в диагностике наследственных заболеваний ПГС, которое позволяет исследовать полностью весь геном.

Благодаря полной расшифровке генома человека и появлению массового параллельного секвенирования последовательность ДНК любого пациента может быть быстро и точно определена. В этой связи в настоящее время в клинической практике активно применяется как полноэкзомное, так и полногеномное секвенирование.

Высокая диагностическая значимость ПЭС и ПГС особенно показывает себя при генетически гетерогенных и фенотипически вариабельных заболеваниях. Для установления диагноза, понимания патогенетических механизмов заболеваний, выделения новых нозологий, для эффективного генетического консультирования семьи, пренатальной диагностики и разработки подходов к таргетному лечению важно использовать данную технологию.

Основными показаниями для назначения полноэкзомного секвенирования являются:

1. Множественные врожденные пороки развития в сочетании с нарушением интеллектуального развития, расстройством аутистического спектра, грубым неврологическим дефицитом;
2. Генетическая гетерогенность и фенотипическая вариабельность является наиболее частой причиной, затрудняющей постановку клинического диагноза;
3. При наличии у пациента специфического фенотипа пациента и/или семейного отягощенного анамнеза, которые указывают на моногенное заболевание, однако исследование предполагаемого причинного гена не выявило патогенного варианта и диагноз установлен не был;
4. В рамках молекулярной онкологии применение ПЭС наиболее эффективно для выявления причин наследственных опухолевых синдромов, а также решения вопроса о назначении таргетной терапии;
5. С целью определения дальнейшего течения заболевания и возможности реабилитации;
6. Медико-генетическое консультирование семьи с целью определения репродуктивного прогноза (возможность рождения здорового ребенка, пренатальная диагностика);
7. Выбор таргетного препарата в терапии орфанных заболеваний;
8. Оценка эффективности применяемой лекарственной терапии;
9. В некоторых случаях рекомендации по эффективности хирургического лечения (например, при моногенных формах эпилепсии).

С 2016–2023 гг. в ГБУЗ «НПЦ спец. мед. помощи детям ДЗМ» методами массового параллельного секвенирования был обследован 331 пациент:

1. Панель генов «Наследственная эпилепсия» – 22 пациента;
2. Полноэкзомное секвенирование – 309 пациентов.

В результате проведенного исследования и анализа полученных результатов у 247 (74,6%) пациентов выявлены варианты нуклеотидной последовательности в генах, у 84 (25,4%) пациентов вариантов не было выявлено, что предполагает либо негенетическую природу заболевания, либо присутствие варианта нуклеотидной последовательности в некодирующей части гена (интрон) или хромосомной перестройки.

В структуре синдромальной патологии (по фенотипам базы данных OMIM) преобладала доля пациентов с выявленными вариантами нуклеотидной последовательности в генах, ассоциированных с энцефалопатией развития и эпилептической энцефалопатией (22,1%), наследственными нарушениями развития нервной системы (13,9%), и в 15,1% случаев нами были диагностированы редкие генетические синдромы (рис. 5). Доля пациентов с моногенными формами нарушения интеллектуального развития составила 9,7%, с нервно-мышечной патологией (врожденные миопатии, миодистрофии) – 4,5% (рис. 5).

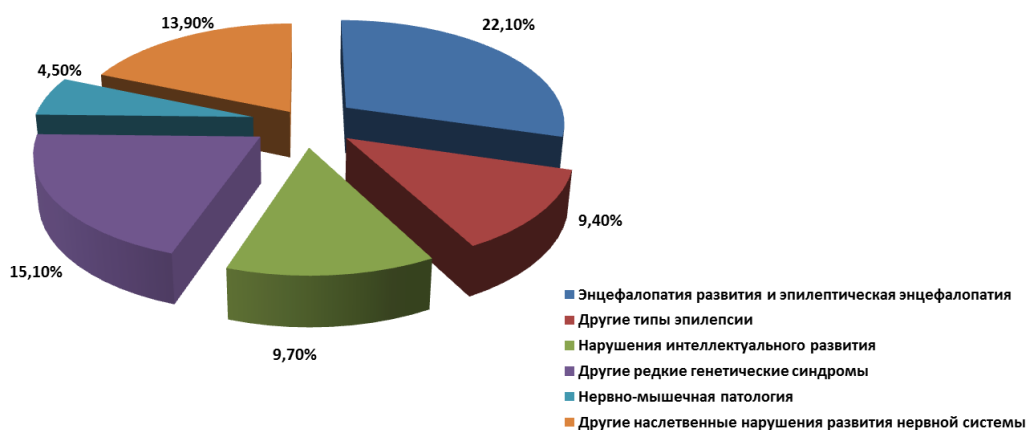


Рисунок 5. Доля синдромальной патологии, выявленной у пациентов по результатам проведенного ПЭС

В структуре выявленных редких генетических синдромов заслуживают внимания следующие интересные клинические случаи: туберозный склероз, синдром врожденной гиповентиляции (делеция в гене *PHOX2B*), клейдокраниальная дисплазия, синдром Хельсмуртел-ван дер Аа, синдром Кулен де Вриз, синдром Ламб-Шаффер, краниокарпо-тарзальная дисплазия, краниометафизарная дисплазия, фронто-фацио-назальная дисплазия, точечная ризомиелическая хондродисплазия, синдром Вервери-Бреди, синдром фатальной бессоницы, синдром Видеманн-Штайнер, синдром Схюрс-Хоймакерс, синдром Арболеда-Тама.

Разнообразие выявленных вариантов нуклеотидной последовательности в генах, наиболее часто встречаемых у пациентов, представлено на рис. 6. У 10 пациентов с вариантами в гене *SCN1A* подтверждена энцефалопатия развития и эпилептическая энцефалопатия 6В (OMIM: # 619317), в 5 случаях у пациентов выявлены варианты в гене *MECP2* (синдром Ретта (#312750), в 6 случаях у пациентов выявлены варианты в гене *TSC2* (туберозный склероз 2 типа (#613254), в 4 случая в генах *PCDH19* – энцефалопатия развития и эпилептическая энцефалопатия, тип 9 (MIM #300088), *GRIN2B* – энцефалопатия развития и эпилептическая энцефалопатия, тип 27 (MIM # 616139) и в гене *SPTAN1*, варианты в котором ассоциированы с развитием энцефалопатии развития и эпилептической энцефалопатии тип 5 (OMIM#613477).

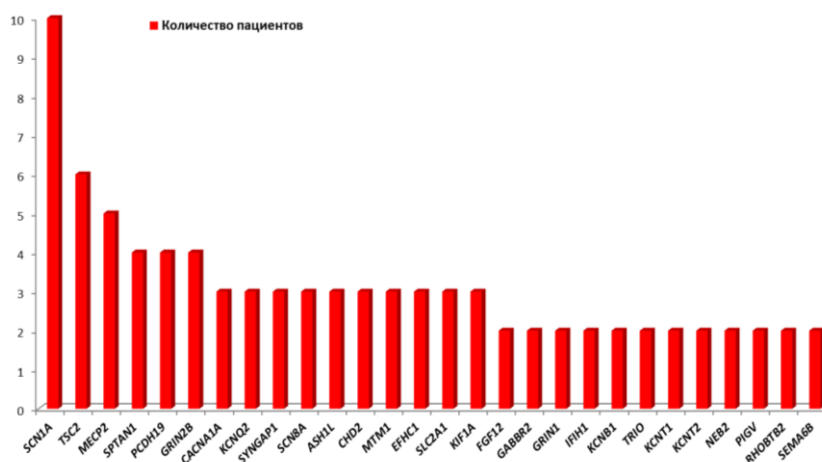


Рисунок 6. Гены, в которых наиболее часто выявлены варианты нуклеотидной последовательности

В структуре синдромальной патологии (по базе данных OMIM) по результатам проведенного полноэкзомного секвенирования преобладала доля пациентов с выявленными вариантами нуклеотидной последовательности в генах, ассоциированных с энцефалопатией развития и эпилептической энцефалопатией, – ЭРиЭ (21,7%; 71/331). Таким образом, на основании клинического наблюдения и данных генетического тестирования была сформирована группа пациентов с ЭРиЭ (71 пациент).

Все пациенты с ЭРиЭ имели фармакорезистентные судороги. Среди обследованных пациентов с ЭРиЭ было 38 (53,5%) мальчиков и 33 (46,5%) девочки; возраст на момент проведения клиничко-генеалогического анализа и генетического исследования варьировал от 1 мес. до 16 лет. Средний возраст начала судорог был 16,2 мес. (от 1 суток до 10 лет), при этом у 12 (16,9%) пациентов дебют возникновения приступов пришелся на неонатальный период (первые 28 дней жизни ребенка). Клиническая характеристика пациентов представлена в таблице 2. Основными типами приступов были тонические, билатеральные или генерализованные тонико-клонические судороги, инфантильные спазмы и миоклонии. Наиболее часто наблюдаемыми электроэнцефалографическими изменениями были фокальные регистрируемые разряды (28,2%), за которыми следовали мультифокальные (16,9%) и гипсаритмия (15,5%). При проведении МРТ в 46,5% (33 пациента) случаев не выявлено изменений головного мозга; наиболее часто описываемыми аномалиями были атрофия головного мозга/нарушение миелинизации (8,5%), расширение желудочков (11,3%), и гипогенезия/агенезия мозолистого тела (5,6%), гипоксически-ишемические изменения (9,8%), глиоз (5,6%), кистозные образования (2,8%). В одном случае пациент имел порок развития головного мозга в виде фокальной кортикальной дисплазии. Количество противосудорожных препаратов, использованных перед генетическим тестированием, колебалось от 2 до 5.

Таблица 2. Клиническая характеристика пациентов с ЭРиЭ (N=71)

Признак	Количество (%)
Мальчики	38 (53,5%)
Девочки	33 (46,5%)
Возраст	1 мес. до 16 лет
Начало судорог, мес.	16,2 мес. (от 1 суток до 10 лет)
Неонатальные судороги	12 (16,9%)
Инфантильные судороги	59 (83,1%)
ЭЭГ	
Фокальные	20 (28,2%)
Мультифокальные	12 (16,9%)
Генерализованные	6 (8,4%)
ДЭРД	2 (2,8%)
Гипсаритмия	11 (15,5%)

ЭА и приступов не зарегистрировано	14 (19,7%)
МРТ	
Расширение желудочков	8 (11,3%)
Гипоксически-ишемические изменения	7 (9,8%)
Атрофия головного мозга/нарушение миелинизации	6 (8,5%)
Гипогенезия/агенезия мозолистого тела	4 (5,6%)
Глиозные изменения	4 (5,6%)
Кистозные образования	2 (2,8%)
Варианты в генах (критерии ACMG)	
Патогенные	20 (28,2%)
Вероятно патогенные	15 (21,1%)
Варианты с неизвестным клиническим значением	36 (50,7%)

При анализе полученных данных полноэкзомного секвенирования показано, что, согласно критериям ACMG, в 20 (28,2%) случаях у обследованных пациентов выявлены описанные в базе данных и научной литературе патогенные варианты нуклеотидной последовательности, в 15 (21,1%) случаях – вероятно патогенные, и у 36 (50,7%) – варианты с неизвестным клиническим значением. На основе онтологии генов преобладали варианты в генах, определяющих активность работы каналов, – *CACNA1A*, *SCN1A*, *SCN1B*, *SCN2A*, *SCN8A*, *KCNB1*, *KCNQ2*, *KCNT1*, *KCNT2*, *CACNA1E* (27/71; 38,02%), влияющих на синаптическую передачу – *GABBR2*, *GABRA1*, *GABRB1*, *GABRB2*, *GABRB3*, *GRIN1*, *GRIN2B*, *GRIN2D*, *STXBP1* (12/71; 16,9%) и везикулярный транспорт/клеточную адгезию – *ATP1A2*, *DNM1*, *PCDH19*, *SPTAN1* (10/71; 14,08%). По типу выявленных вариантов преобладали миссенс-мутации (53/71; 74,6%), приводящие к изменению аминокислоты в белке; варианты, приводящие к потере функции (loss-of-function), были представлены делециями и дупликациями нуклеотидов (варианты со сдвигом рамки считывания) – 4/71 (5,6%) и 2/71 (2,8%), соответственно и нонсенс-мутациями (варианты, приводящие к остановке синтеза полнофункционального белка) – 5/71 (7,04%) пациентов. У остальных пациентов с ЭРиЭ выявлены варианты, влияющие на эффективность сплайсинга, – 7/71 (9,8%). Данные представлены на рис. 7.

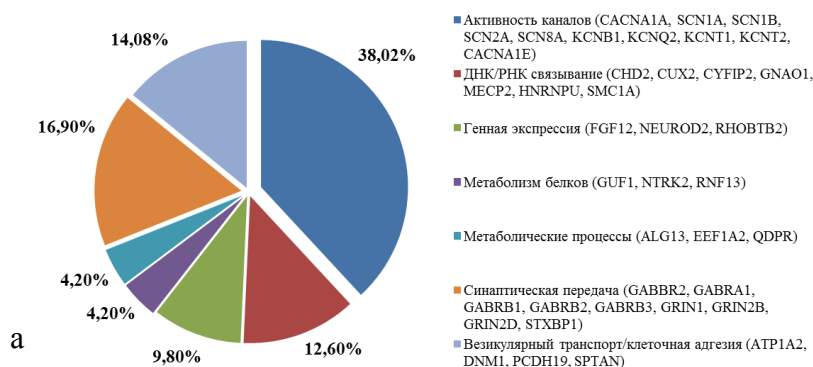




Рисунок 7. (а) Идентифицированные гены, разделенные на макрокатегории на основе онтологии генов (Gene Ontology); (б) Типы мутаций; (в) Тип наследования выявленных вариантов

По типу наследования в большинстве случаев были выявлены варианты нуклеотидной последовательности в генах, ассоциированных с аутосомно-доминантными формами ЭРиЭ (64/71; 90,1%).

По результатам проведенного полноэкзомного секвенирования, согласно критериям ACMG, у 20/71 (28,2%) пациентов определены патогенные варианты нуклеотидной последовательности, у 15 (21,1%) – вероятно патогенные, и в остальных случаях (36/71; 50,7%) – варианты с неизвестным клиническим значением. Характеристика выявленных патогенных вариантов представлена в таблице 3.

Таблица 3. Патогенные варианты (критерии ACMG) нуклеотидной последовательности, выявленные у пациентов с ЭРиЭ (N=20)

Ген	Транскрипт (RefSeq)	Замена нуклеотида	Замена аминокислоты	Тип варианты	Зиготность/тип наследования
<i>KCNT1</i>	NM_020822.3	c.1420C>T	p.Arg474Cys	миссенс	гетерозигота АД
<i>PCDH19</i>	NM_001184880.2	c.565G>T	p.Glu189X	нонсенс	гетерозигота X сцепленное
<i>PCDH19</i>	NM_001184880.2	c.1091dup	p.Tyr366LeufsTer10	сдвиг рамки считывания (дупликация)	гетерозигота X сцепленное
<i>PCDH19</i>	NM_001184880.2	c.1114C>T	p.Arg372Trp	миссенс	гетерозигота X сцепленное
<i>SCN1A</i>	NM_001165963.4	c.1034G>A	p.Cys345Tyr	миссенс	гетерозигота АД
<i>SCN1A</i>	NM_001165963.4	c.1837C>T	p.Arg613X	нонсенс	гетерозигота АД
<i>SCN1A</i>	NM_001165963.4	c.664C>T	p.Arg222X	нонсенс	гетерозигота АД
<i>SCN1A</i>	NM_001165963.4	c.1178G>A	p.Arg393His	миссенс	гетерозигота АД
<i>SCN1A</i>	NM_001165963.4	c.1639_1640 del	p.Lys547GlufsTer23	сдвиг рамки считывания (делеция)	гетерозигота АД
<i>SCN1A</i>	NM_001165963.4	c.3970-1G>A	сайт сплайсинга	сплайсинг акцептор	гетерозигота АД
<i>ALG13</i>	NM_001099922.3	c.320A>G	p.Asn107Ser	миссенс	гетерозигота X сцепленное
<i>FGF12</i>	NM_004113.6	c.155G>A	p.Arg52His	миссенс	гетерозигота АД
<i>KCNB1</i>	NM_004975.4	c.629C>T	p.Thr210Met	миссенс	гетерозигота АД

<i>GRIN2B</i>	NM_000834.5	c.2470A>G	p. Met824Val	миссенс	гетерозигота АД
<i>GNAO1</i>	NM_020988.3	c.155A>G	p. Gln52Arg	миссенс	гетерозигота АД
<i>KCNQ2</i>	NM_172107.4	c.1632-1G>A	сайт сплайсинга	сплайсинг акцептор	гетерозигота АД
<i>KCNQ2</i>	NM_172107.4	c.1573C>T	p.Arg553Trp	миссенс	гетерозигота АД
<i>SCN2A</i>	NM_001040142.2	c.2995G>A	p. Glu999Lys	миссенс	гетерозигота АД
<i>SCN8A</i>	NM_001330260.2	c.5614C>T	p.Arg1872Trp	миссенс	гетерозигота АД
<i>MECP2</i>	NM_001110792.2	c.397C>T	p.Arg133Cys	миссенс	гетерозигота АД

Доля пациентов с выявленными вариантами нуклеотидной последовательности в генах, ассоциированных с моногенными формами интеллектуального нарушения, составила (по OMIM – Intellectual developmental disorder) – 9,7% (29 пациентов). При анализе полученных данных полноэкзомного секвенирования показано, что, согласно критериям ACMG, в 2 (6,9%) случаях у обследованных пациентов выявлены описанные в базе данных и научной литературе патогенные варианты нуклеотидной последовательности, в 5 (17,2%) случаях – вероятно патогенные, и у 22 (75,9%) – варианты с неизвестным клиническим значением. Варианты были выявлены в следующих генах – *KIRREL3*, *CDH15*, *ZMYND11*, *SETBP1*, *ASH1L*, *PIDD1*, *FBXO11*, *BRPF1*, *EPB41L1*, *SETD5*, *DOCK7*, *HIVEP2*, *TRIO*, *SYNGAP1*, *KMT2B*, *CDK8*, *MACF1*, *KIAA2022*, *MECP2*, *TAF1*, *ZNF292*, *DDX3X*, *NSUN2*, *FOXP2*. По типу выявленных вариантов преобладали миссенс-мутации (23/29;79,3%), приводящие к изменению аминокислоты в белке; варианты, приводящие к потере функции (loss-of-function), были представлены делециями и дупликациями нуклеотидов (мутации со сдвигом рамки считывания) – 3/29 (10,3%), и нонсенс-мутации (варианты, приводящие к остановке синтеза полнофункционального белка) – у 3/29 (10,3%) пациентов. По типу наследования у 20/29 (68,9%) пациентов выявлены варианты в генах с аутосомно-доминантным наследованием, у 2/29 (6,9%) – с аутосомно-рецессивным типом наследования, и у 7/29 (24,1%) – с X-сцепленным типом наследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие молекулярной и клеточной биологии является отличительной чертой современной медицинской науки. Основу персонализированной формирует именно молекулярная медицина, которая развита на прогностическом и профилактическом принципах, позволяющих раскрыть потенциальные и адаптационные возможности организма человека и увеличить продолжительность его активной жизни.

Потребность в генетическом обследовании детей с врожденными и наследственными заболеваниями в многопрофильной специализированной педиатрической клинике составляет 22,3%, что соответствует данным мировой литературы, следовательно, данный вид обследования показан в рамках совершенствования ранней диагностики, лечения и реабилитации детей с редкими болезнями. По результатам исследования и проведенного анализа установлено большое разнообразие нозологических форм наследственных заболеваний. Показаны возможности генетической лаборатории ГБУЗ «НПЦ спец. мед. помощи детям ДЗМ» и научно обосновано использование методов молекулярно-генетической диагностики наследственной патологии у детей. Показано, что подтверждение более чем 50% случаев генетических заболеваний молекулярно-генетическими методами дает

возможность провести полноценный клинико-генетический анализ для выявления генно-фенотипических корреляций и планировать дальнейшее медицинское наблюдение за ребенком. Клиническая эффективность полноэкзомного секвенирования с целью установления молекулярного диагноза в диагностике наследственной и врожденной патологии составила 74,6%. В рамках реализации стратегии развития молекулярно-генетической диагностики проанализирован спектр выявленных вариантов нуклеотидных последовательностей в генах, ответственных за возникновение наследственной и врожденной патологии. На основе полученных данных и выявленных вариантов даны рекомендации врачам по эффективности лечения, а также разработаны индивидуальные программы реабилитации, в некоторых случаях исключающие хирургическую коррекцию дефекта у пациентов с двигательными нарушениями.

В практику практического здравоохранения активно внедрены методы массового параллельного секвенирования. Необходимо отметить, что для их полноценного и экономически обоснованного применения важно составлять грамотный дизайн исследования для повышения эффективности поиска патогенных вариантов. Анализ и интерпретация полученных результатов представляет самую важную и сложную задачу при применении данной технологии.

Применение ПЭС и ПГС в поиске причины заболевания позволит не только найти каузативный вариант нуклеотидной последовательности, поставив финальную точку в длительной одиссее для пациента, но и углубить наши знания о патогенезе заболевания.

Важно помнить, что до начала назначения и проведения любого генетического исследования пациенты и члены их семей обязательно должны быть проинформированы направляющим врачом об этических аспектах. Особенно это касается выявления так называемых «вторичных находок», которые являются, согласно рекомендациям ACMG, обязательными для их включения в заключение лаборатории. «Вторичные находки» – варианты в гене, не связанном с основным направляющим диагнозом, но пациент должен быть о них обязательно информирован в целях профилактики осложнения заболевания и возможности назначения ранней таргетной терапии.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Абрамов А.А., Иванова Н.М., Петриченко А.В., Неудахин Е.В., Маркова С.И., Юрченко М.Ю., Шароев Т.А. Молекулярно-генетические особенности костных опухолей у детей // «Quantum satis» – 2023. – Т. VI, №1. – С.20-23.
2. База данных Online Mendelian Inheritance in Man – OMIM – URL: <https://www.omim.org/phenotypicSeries/PS308350?sort=phenotype> (дата обращения 12.03.2024).
3. Блинникова О.Е. Семиотика наследственных болезней – Москва: Альманах «Исцеление», 2000. – 113 с.
4. Бойченко Е.И., Глеков И.В., Казанцев А.П., Капкова О.А., Керимов П.А., Рубанский М.А., Рубанская М.В., Рыбакова Д.В. (2014) Клинические рекомендации по диагностике и лечению детей, больных нефробластомой (опухоль Вильмса). (Дата обращения: 26.03.2024).
5. Демикова Н.С., Баранова Е.Е. Показания к полногеномному секвенированию у больных с подозрением на наследственные редкие заболевания: Учебное пособие / ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России. – М.: ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, 2022. – 102 с.
6. Жилина С.С., Кожанова Т.В., Мещерякова Т.И., Осипова К.В., Айвазян С.О., Притыко А.Г. Генетические аспекты и генотип-фенотипические корреляции при редких формах эпилептической энцефалопатии у детей // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2017. – №4. – С.169.
7. Иванов В.И., Барышникова Н.В., Билева Дж.С., Дадали Е.Л., Кузнецова О.В., Поляков А.В. Генетика – Москва: Учебник для вузов, ИЦК «Академкнига», 2006. – 603 с.
8. Иванов В.И., Киселев Л.Л. Геномика – медицине. Научное издание – Москва: ИЦК «Академкнига, 2005. – 392 с.
9. Кобринский Б.А. Персонализированная медицина: геном, электронное здравоохранение и интеллектуальные системы. Часть 1. Геномика и мониторинг клинических, данных // Рос вестн перинатол и педиатр. – 2017. – Т.62, №.5. – С. 16-20.
10. Кожанова Т.В., Жилина С.С., Айвазян С.О., Ананьева Т.В., Абрамов А.А., Беленикин М.С., Мещерякова Т.И., Мутовин Г.Р., Заваденко Н.Н. Диагностика идиопатических форм эпилепсии у детей на основании алгоритма молекулярно-генетического исследования // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 2016. – №11. – С. 49-56.
11. Кожанова Т.В., Жилина С.С., Мещерякова Т.И., Айвазян С.О., Осипова К.В., Сушко Л.М., Лукьянова Е.Г., Пырьева Е.А., Притыко А.Г. Клиническая и молекулярно-генетическая диагностика синдрома дефицита транспортера глюкозы I типа у пациентов психоневрологического отделения // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. – 2017. – №1. – С. 156-164.
12. Кожанова Т. В. Возможности и достижения использования массового параллельного секвенирования в диагностике наследственных заболеваний с поражением нервной системы // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. – 2023. – Т. 15, № 1. – С. 44-52.
13. Кожанова Т.В., Жилина С.С., Мещерякова Т.И., Лукаш Е.Н., Абрамов А.А., Маркова С.И., Заваденко Н.Н. Спектр наследственной и врожденной патологии в многопрофильной специализированной детской клинике: персонифицированный подход к диагностике // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. – 2021. – №2 (100). – С. 204-210.

14. Кожанова Т.В., Жилина С.С., Мещерякова Т.И., Осипова К.В., Айвазян С.О., Притыко А.Г. Эффективность экзомного секвенирования в диагностике эпилепсии у детей. // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. — 2019. — Vol.11 (4). -Р. 409-417.
15. Козлова С.И., Демикова Н.С. Наследственные синдромы и медико-генетическое консультирование – Москва: КМК, Авторская академия, 2007. – 448 с.
16. Краснопольская К.Д. Наследственные болезни обмена веществ. Справочное пособие для врачей – Москва: РОО «Центр социальной адаптации и реабилитации детей «Фохат», 2005. – 364 с.
17. Мутовин Г.Р., Жилина С.С., Заваденко Н.Н., Беленикин М.С. Признаки и болезни с традиционным и нетрадиционным наследованием. Учебно-методическое пособие – Москва: Специальное издательство медицинских книг, 2015. – С.104.
18. Пальцев М.А. «Медицина будущего. Персонализированная медицина: опыт прошлого, реалии завтрашнего дня». – М.: Российская академия наук, 2020. – 152 с.
19. Правительство Российской Федерации. Распоряжение от 28 декабря 2012 года N 2580-р [Об утверждении Стратегии развития медицинской науки в Российской Федерации на период до 2025 года]. – URL: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_140249/ (дата обращения 12.12.2023).
20. О деятельности медико-генетических консультаций и центров в субъектах Российской Федерации. Материалы заседания Совета по региональному здравоохранению при Совете Федерации Федерального Собрания Российской Федерации (Совет Федерации, 25 сентября 2020 года). – URL: <http://council.gov.ru/media/files/oPnf3ZdrMbAOBrNTPEhzA6hL1cNtwgpr.pdf>. (дата обращения 12.03.2024)
21. Рыжкова О. П., Кардымон О. Л., Прохорчук Е. Б., Коновалов Ф. А., Масленников А. Б., Степанов В. А., Афанасьев А. А., Заклязьминская Е. В., Костарева А. А., Павлов А. Е., Голубенко М. В., Поляков А. В., Куцев С. И. Руководство по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) // Медицинская генетика. – 2017. -Том 16, №7. – С.4-17.
22. Тарасов К.Е., Веников В.К., Фролова А.И. Логика и семиотика диагноза – Москва: Медицина, 1983. – 272 с.
23. Фогель Ф., Мотульски А. Генетика человека: Мир, 1989. – 308 с.
24. Шароев Т.А., Стилиди И.С., Казанцев А.П., Швецова М.В.. "Билатеральная нефробластома у детей: клиника, диагностика, лечение (собственные наблюдения за период 1964-2007 гг // Онкоурология. – 2008. – №. 3. – С. 24-30.
25. Chen C, Fang F, Wang X, Lv J, Wang X, Jin H. Phenotypic and Genotypic Characteristics of SCN1A Associated Seizure Diseases // Front Mol Neurosci. – 2022. – Vol. 15. – P. 821012.
26. Ding J, Li X, Tian H, Wang L, Guo B, Wang Y, Li W, Wang F, Sun T. SCN1A Mutation-Beyond Dravet Syndrome: A Systematic Review and Narrative Synthesis // Front Neurol. – 2021. – Vol. 12. – P.743726.
27. Guerrini R, Conti V, Mantegazza M, Balestrini S, Galanopoulou AS, Benfenati F. Developmental and epileptic encephalopathies: from genetic heterogeneity to phenotypic continuum // Physiol Rev. – 2023. – Vol. 103. – P. 433-513.
28. Koch H, Weber YG. The glucose transporter type 1 (Glut1) syndromes // Epilepsy Behav. – 2019. – Vol. 91. – P. 90-93.

29. Buchanan, E. P., Xue A. S., Hollier L. H. Craniofacial Syndromes // Plastic and Reconstructive Surgery. – 2014. – Vol. 134. – P.128-153.
30. Kasi AS, Li H, Harford KL, Lam HV, Mao C, Landry AM, Mitchell SG, Clifton MS, Leu RM. Congenital Central Hypoventilation Syndrome: Optimizing Care with a Multidisciplinary Approach // J Multidiscip Healthc. – 2022.- Vol. 15. – P. 455-469.
31. Kozhanova T.V., Zhilina S.S., Mescheryakova T.I., Ananieva T.V., Luk`yanova E.G., Sushko L.M., Prokop`eva N.P., Osipova K.V., Aivazyan S.O., Belenikin, M.S., Bruhanova N.O, Kanivets I.V., Konovalov F.A., Tolmacheva E.R., Prityko A.G. Significance of targeted exome sequencing in the diagnosis of genetic disorders leading to the development of epileptic encephalopathy // Journal of bioinformatics and genomics. – 2017. –Vol. 2. – P. 1-6.
32. Kutkowska-Kaźmierczak A., Gos M., Obersztyn E. Craniosynostosis as a clinical and diagnostic problem: molecular pathology and genetic counseling // J Appl Genet. – 2018. – Vol. 59. – P. 133-147.
33. Ma VK, Mao R, Toth JN, Fulmer ML, Egense AS, Shankar SP. Prader-Willi and Angelman Syndromes: Mechanisms and Management // Appl Clin Genet. – 2023. - Vol.16. - P. 41-52.
34. Parenti I, Rabaneda LG, Schoen H, Novarino G. Neurodevelopmental Disorders: From Genetics to Functional Pathways // Trends Neurosci. – 2020. – Vol. 43(8). – P. 608-621.
35. Perucca P, Bahlo M, Berkovic SF. The Genetics of Epilepsy // Annu Rev Genomics Hum Genet. – 2020. – Vol. 31. – P. 205-230.
36. Richards S., Aziz N., Bale S., Bick D., Das S., Gastier-Foster J., Grody W., Hegde M., Lyon E., Spector E., Voelkerding K., Rehm H. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology // Genet. Med. – 2015. – Vol.17. – P. 405–424.
37. Sasaki R., Osaki M, Okada F. MicroRNA-Based Diagnosis and Treatment of Metastatic Human Osteosarcoma // Cancers (Basel). – 2019. – Vol.11(4). – P. 553.
38. Suárez B, Solé C, Márquez M, Nanetti F, Lawrie CH. Circulating MicroRNAs as Cancer Biomarkers in Liquid Biopsies // Adv Exp Med Biol. – 2022. – Vol. 1385. – P. 23-73.
39. South S., Lee C., Lamb A., Higgins A., Kearney H. ACMG Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: revision 2013 // Genet Med. – 2013. – Vol. 15. – P. 901-909.
40. Stanton E, Urata M, Chen JF, Chai Y. The clinical manifestations, molecular mechanisms and treatment of craniosynostosis // Dis Model Mech. – 2022. – Vol. 15(4). – P. dmm049390.
41. Trang H, Samuels M, Ceccherini I, Frerick M, Garcia-Teresa MA, Peters J, Schoeber J, Migdal M, Markstrom A, Ottonello G, Piumelli R, Estevao MH, Senecic-Cala I, Gnidovec-Strazisar B, Pflieger A, Porto-Abal R, Katz-Salamon M. Guidelines for diagnosis and management of congenital central hypoventilation syndrome // Orphanet J Rare Dis. – 2020. – Vol. 15(1). – P. 252.
42. Zimmern V, Minassian B, Korff C. A Review of Targeted Therapies for Monogenic Epilepsy Syndromes // Front Neurol. – 2022. – Vol. 13.- P. 829116.
43. Umair M. Rare genetic disorders: Beyond whole-exome sequencing // J Gene Med. 2023. – Vol. 25(10). – P. e3503.
44. Vetri L, Cali F, Saccone S, Vinci M, Chiavetta NV, Carotenuto M. Whole Exome Sequencing as a First-Line Molecular Genetic Test in Developmental and Epileptic Encephalopathies // Int J Mol Sci. – 2024. –Vol. 25(2). – P. 1146.

45. Weese-Mayer DE, Rand CM, Khaytin I, Slattery SM, Yap KL, Marazita ML, Berry-Kravis EM. Congenital Central Hypoventilation Syndrome. 2004 Jan 28 [updated 2021 Jan 28]. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Amemiya A, editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2024.
46. Wilkie AOM, Johnson D, Wall SA. Clinical genetics of craniosynostosis // *Curr Opin Pediatr.* – 2017. – Vol. 29(6). – P. 622-628.
47. World Health Organization (WHO). – URL: <https://www.who.int/genomics/public/geneticdiseases/> (дата обращения 12.03.2024).
48. Wright CF, FitzPatrick DR, Firth HV. Paediatric genomics: diagnosing rare disease in children // *Nat Rev Genet* - 2018. – Vol. 19. – P. 253-268.

Символы, используемые при составлении родословной

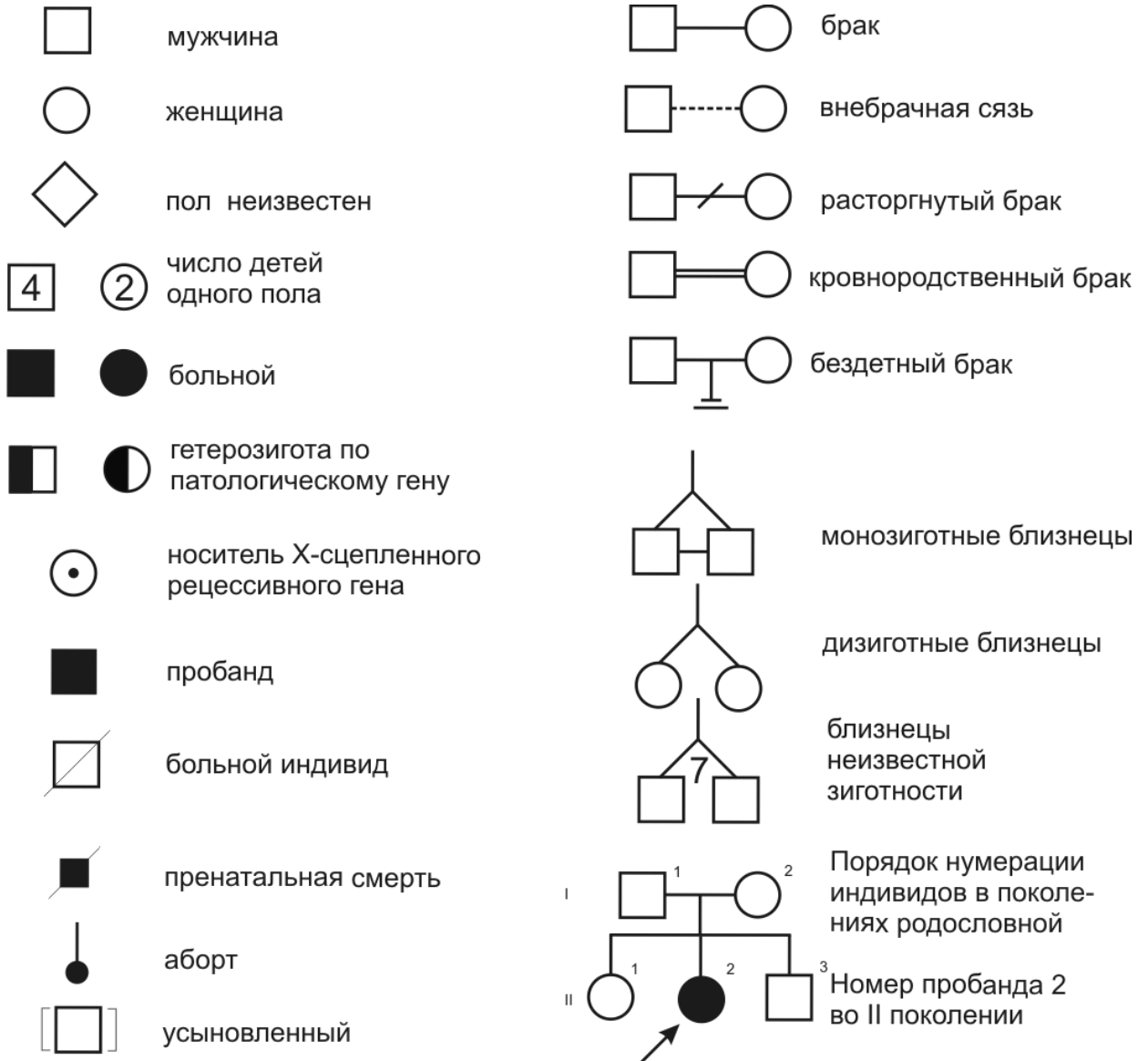


Схема проведения генетического исследования

