

- relationships / A. Fujiki, M. Sugao, K. Nishida et al. // J. Cardiovasc. Electrophysiol. — 2004. — Vol. 15. — P. 59–63.
18. *Gaita, F.* Short *Q–T* syndrome: pharmacological treatment / F. Gaita, C. Giustetto, F. Bianchi et al. // J. Amer. Coll. Cardiol. — 2004. — Vol. 43. — P. 1494–1499.
  19. *Gussak, I.* Short *Q–T* syndrome — 5 years of progress / I. Gussak, P. Bjerregaard // J. Electrocardiol. — 2005. — Vol. 38. — P. 375–377.
  20. *Haissaguerre, M.* Mapping and ablation of idiopathic ventricular fibrillation / M. Haissaguerre, M. Shoda, P. Jais et al. // Circulation. — 2002. — Vol. 106. — P. 962–967.
  21. *Haissaguerre, M.* Mapping and ablation of ventricular fibrillation associated with long-*QT* and Brugada syndromes / M. Haissaguerre, F. Extramiana, M. Hocini et al. // Circulation. — 2003. — Vol. 108. — P. 925–928.
  22. *Haissaguerre, M.* Role of Purkinje conducting system in triggering of idiopathic ventricular fibrillation / M. Haissaguerre, D. C. Shah, P. Jais et al. // Lancet. — 2002. — Vol. 359. — P. 677–678.
  23. *Haissaguerre, M.* Sudden cardiac arrest associated with early repolarization / M. Haissaguerre, N. Derval, F. Sacher // N. Engl. Med. — 2008. — Vol. 358. — P. 2016–2023.
  24. *Hong, K.* Short *Q–T* syndrome and atrial fibrillation caused by mutation in *KCNH2* / K. Hong, P. Bjerregaard, I. Gussak, R. Brugada // J. Cardiovasc. Electrophysiol. — 2005. — Vol. 16. — P. 394–396.
  25. *Jervell, A.* Congenital deafmutism, functional heart disease with prolongation of the *Q–T* interval and sudden death / A. Jervell, F. Lange-Nielsen // Amer. Heart J. — 1957. — Vol. 54. — P. 59–68.
  26. *Katakura, S.* Localization of optimal ablation site of idiopathic VT from right and left ventricular outflow tract by body surface ECG / S. Katakura, W. Shimizu, K. Matsuo // Circulation. — 1998. — Vol. 98. — P. 1525–1533.
  27. *Konty, F.* Self-terminating idiopathic ventricular fibrillation presenting as syncope: a 40-year follow-up report / F. Konty, J. Dale // J. Intern. Med. — 1990. — Vol. 227. — P. 211–213.
  28. *Nam, G. B.* Augmentation of *J* waves and electrical storms in patients with early repolarization / G. B. Nam // N. Engl. Med. — 2008. — Vol. 358. — P. 2078–2079.
  29. *Remme, C. A.* Diagnosis and long-term follow-up of the Brugada syndrome in patients with idiopathic ventricular fibrillation / C. A. Remme, E. F. Wever, A. A. Wilde et al. // Eur. Heart J. — 2001. — Vol. 22. — P. 400–409.
  30. *Rosso, R.* Elevation in survivors of primary ventricular fibrillation and matched control subjects incidence and clinical significance / R. Rosso, E. Kogan et al. // J. Amer. Coll. Cardiol. — 2008. — Vol. 52. — P. 1231–1238.
  31. *Shimizu, W.* Mutation site specific differences in arrhythmic risk and sensitivity to sympathetic stimulation in the LQT1 form of congenital long *Q–T* syndrome: multicenter study in Japan / W. Shimizu, M. Horie, S. Ohno et al. // J. Amer. Coll. Cardiol. — 2004. — Vol. 44. — P. 117–125.
  32. *Takagi, M.* Clinical characteristics of patients with spontaneous or inducible ventricular fibrillation without apparent heart disease presenting with *J* wave and *ST* segment elevation in inferior leads / M. Takagi, N. Aihara, H. Takaki et al. // J. Cardiovasc. Electrophysiol. — 2000. — Vol. 11. — P. 844–848.
  33. The Antiarrhythmic versus Implantable Defibrillators (AVID) Investigators. A comparison of antiarrhythmic-drug therapy with implantable defibrillators in patients resuscitated from nearfatal ventricular arrhythmias // N. Engl. J. Med. — 1997. — Vol. 337. — P. 1576–1583.
  34. *Varnava, A. M.* Hypertrophic cardiomyopathy: histopathological features of sudden death in cardiac troponin T disease / A. M. Varnava, P. M. Elliott, C. Baboonian et al. // Circulation. — 2001. — Vol. 104. — P. 1380–1384.
  35. *Viskin, S.* Idiopathic ventricular fibrillation / S. Viskin, B. Belhassen // Amer. Heart J. — 1990. — Vol. 120. — P. 661–671.
  36. *Viskin, S.* Is idiopathic ventricular fibrillation a short *QT* syndrome? Comparison of *QT* intervals of patients with idiopathic ventricular fibrillation and healthy controls / S. Viskin, D. Zeltser, M. Ish-Shalom et al. // Heart Rhythm. — 2004. — Vol. 1. — P. 587–591.
  37. *Viskin, S.* Mode of onset of malignant ventricular arrhythmias in idiopathic ventricular fibrillation / S. Viskin, M. Lesh, M. Eldar et al. // J. Cardiovasc. Electrophysiol. — 1997. — Vol. 8. — P. 1115–1120.
  38. *Wang, Y.* Patients with supraventricular tachycardia presenting with aborted sudden death: incidence, mechanism and long-term follow-up / Y. Wang, J. Griffin, M. Lesh et al. // J. Amer. Coll. Cardiol. — 1991. — Vol. 18. — P. 1720–1721.
  39. *Wever, E. F.* Sudden death in patients without structural heart disease / E. F. Wever, E. O. Robles de Medina // J. Amer. Coll. Cardiol. — 2004. — Vol. 43. — P. 1137–1144.
  40. *Wolpert, C.* Intravenous drug challenge using flecainide and ajmaline in patients with Brugada syndrome / C. Wolpert, C. Echternach, C. Veltmann et al. // Heart Rhythm. — 2005. — Vol. 2. — P. 254–260.
  41. *Yan, G. X.* Cellular basis for the normal wave *T* and the electrocardiographic manifestations of the long *Q–T* syndrome / G. X. Yan, C. Antzelevitch // Circulation. — 1998. — Vol. 98. — P. 1928–1936.

Поступила 30.11.2010

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2010

УДК 616.12-008.318:575

## ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ У ПАЦИЕНТОВ С НАРУШЕНИЯМИ РИТМА

О. Л. Бокерия\*, О. Н. Кислицина, И. В. Тетвадзе, А. С. Мордвинова

Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А. Н. Бакулева (дир. — академик РАМН Л. А. Бокерия) РАМН, Москва

На протяжении предшествующих нескольких десятилетий достижения в области молекулярной генетики и медицины позволили выявить около 4000 генетически обусловленных

заболеваний, большинство из которых встречаются относительно редко. Сегодня у клиницистов есть возможность оценивать результаты около 1000 генетических тестов, которые проводятся более чем

\* Адрес для переписки: e-mail: obockeria@mail.ru

в 600 диагностических лабораториях по всему миру. Кроме того, ряд генетических тестов можно выполнить на базе исследовательских программ.

Необходимо отметить, что генные изменения являются частой причиной заболеваемости и смертности. Сегодня уже очевидно, что к 25 годам 80 из 1000 новорожденных (8%) будут иметь проблемы со здоровьем, вызванные нарушением функционирования генного аппарата. Сюда входят многофакторные нарушения (4,64%), врожденные патологии генетической этиологии (2,66%), моногенные расстройства (0,36%), хромосомные нарушения (0,18%), а также расстройства неопределенной генной этиологии (0,12%) [3]. Однако, указывая такие показатели, мы недооцениваем истинную распространенность заболеваний, на течение которых в значительной мере могут влиять гены человека.

Существует множество патологических состояний, которые на первый взгляд не являются генетически обусловленными, но их течение может существенно зависеть от генетических факторов, так же как и от факторов окружающей среды. Незначительные генетические нарушения могут оставаться незамеченными. Наконец, генные нарушения, имеющие в основе низкую пенетрантность и меняющуюся экспрессивность, могут быть не диагностированы у асимптоматичных индивидов.

Бурное развитие молекулярной электрофизиологии сердца в течение предыдущего десятилетия позволило выявить фундаментальные генетические причины, лежащие в основе многих аритмогенных расстройств, связанных с возникновением внезапной сердечной смерти. К ним относятся синдром удлиненного интервала  $Q-T$  (СУИ  $Q-T$ ), синдром Андерсена–Тавила, синдром Тимоти, синдром укороченного интервала  $Q-T$ , катехоламининдуцированная полиморфная желудочковая тахикардия, синдром Бругада, семейные формы атриовентрикулярной блокады и фибрилляции предсердий (ФП). В дополнение необходимо отметить молекулярный субстрат процессов кардиомиопатии, которые, как известно, также являются причиной внезапной аритмогенной смерти. К последним относятся дилатационная, гипертрофическая и рестриктивная кардиомиопатии, а также аритмогенная кардиомиопатия правого желудочка. На современном этапе развития медицинской генетики стала возможной диагностика указанных видов каналопатий и кардиомиопатий в специализированных клинических и исследовательских лабораториях.

В данной статье рассмотрены положения современной молекулярной генетики, мутации, лежащие в основе нарушений электрофизиологических процессов в сердце, и возможности

генетического тестирования. Вначале будут представлены фундаментальные положения молекулярной генетики, включая организацию человеческого генома, передачу генетического материала, различные типы наследования и разновидности мутаций при генетически обусловленных заболеваниях, затем мы обсудим технологии, используемые при генетическом тестировании. И в конце будет подведен итог: сделаны выводы о целесообразности выполнения генетического тестирования, о его значении в практической медицине, о преимуществах и недостатках используемых методов, а также затронуты этические, правовые и социальные аспекты данной проблемы.

### Основные положения молекулярной генетики

Благодаря усилиям ученых из разных стран в феврале 2001 г. был полностью расшифрован геном человека, который позволил определить архитектуру и местоположение большинства генов в геноме. Геном представляет собой совокупность всей генетической информации, так называемую ДНК, которая распределена между 46 хромосомами, 22 пары из которых аутосомные и две — половые (XY) [11, 17]. Каждая хромосома представлена плотно укомплектованной линейной структурой двухспиральной ДНК, уникальна по своему строению и в большинстве случаев классифицируется соответственно ее размеру. Более сложной является организация геномной ДНК. Большая часть генома составлена однотипной ДНК с точно определенной последовательностью нуклеотидов. Остальная часть генома составлена несколькими разновидностями повторяющихся нуклеиновых кислот; последовательности одних являются точными копиями ДНК, другие — с наличием некоторых изменений. Геном человека состоит из 2,9 млн пар основ генетической информации, соответствующих молекулярным копиям около 35 000 генов, экспрессия которых фактически организует человеческий организм. Геном мухи *Drosophila melanogaster* состоит из 120 млн пар основ генной информации и 13 600 генов. Однако, несмотря на то что геном человека содержит в три раза меньше генов, последние имеют более сложную организацию и являются основой гораздо большего количества белков благодаря альтернативным механизмам кодирования последовательности в пределах генов.

В 1953 г. Дж. Уотсон и Ф. Крик открыли молекулярную основу генетической информации: дезоксирибонуклеиновую кислоту, или молекулу ДНК. Оказалось, что ДНК является полимерной макромолекулой, составленной из «строительных блоков» — дезоксирибонуклеотидов, которые

могут быть четырех типов: аденин (А), гуанин (Г), тимин (Т) и цитозин (Ц). По существу, молекула ДНК полимеризована в длинную цепочку из нуклеотидов и сформирована по типу двойной спирали таким образом, что две параллельные комплементарные цепочки соединены нековалентными (с мягким сцеплением) водородными связями с помощью комплементарных между собой оснований, где А всегда находится в паре с Т, а Г — в паре с Ц. Молекула ДНК по форме устроена как правосторонняя загнутая по спирали лестница, а ее участки, которые оснащены генетической информацией в форме генетического кода, называются генами. Примерно 30% генома составлено генами. Однако 2% геномной ДНК образовано белок-кодируемыми сегментами с наличием генов, называемых экзонами. Между экзонами находятся промежуточные участки ДНК, называемые интронами, которые не являются частью генетического кода. На пути к первому экзону располагается регуляторная единица, называемая протомером, которая контролирует процесс транскрипции наследственной информации, определенной в последовательности генов.

Унаследованный генетический материал переносится к конечному продукту (белку) благодаря двухэтапному процессу, который является основополагающим в молекулярной биологии. Передача генной информации начинается с транскрипции — процесса, когда генетический код считывается с образованием молекул РНК (рибонуклеиновой кислоты), называемых мессенджерами. Вначале происходит диссоциация двухспиральной молекулы ДНК и формирование синтезированной молекулы комплементарной РНК. Первично образованная РНК подвергается сплайсингу — процессу, когда удаляются специфические некодируемые участки интронов, при этом расположение интронов и экзонов строго соответствует местам разединения, что очень важно для правильного формирования РНК. Далее происходит процесс, называемый транскрипцией, когда информация с матричной РНК считывается с формированием протеинов, которые будут далее выполнять биологическую функцию. Белки, или полипептиды, — это полимерные структуры, их единицами являются аминокислоты. Составную часть белков определяет так называемый третичный генетический код, или кодон (три последовательных нуклеотида). Существуют 64 типа кодонов, соответствующие 24 отдельным аминокислотам. Один кодон — АТГ кодирует аминокислоту метионин, и он является всегда первым, или стартовым, кодоном, с которого начинается считывание информации. Три кодона — ТАА, ТАГ и ТГА — называются стопкодонами, так как считывание информации с матричного

РНК на них останавливается, сигнализируя завершение процесса формирования пептида. Генетический код является множественным — более чем один кодон может кодировать одну и ту же аминокислоту. Например, замена одного концевой нуклеотида в кодоне может не вызвать нарушение последовательности синтеза аминокислот в пептиде. Последовательность аминокислот в пептиде уникальна и обуславливает характерное только для конкретного пептида функционирование.

Аминокислоты могут быть гидрофобные и гидрофильные, отрицательно заряженные (обладать кислотными свойствами) или положительно заряженные (обладать щелочными свойствами). Замена даже одной аминокислоты в структуре пептида может повлечь серьезные нарушения в его функционировании и, следовательно, быть причиной болезни. В целом, только идущие друг за другом нуклеотиды, составляющие область кодирования в гене, подвергаются нумерации. Интроны нумеруются относительно первого или последнего нуклеотида в экзоне, следующих за самими интронами или предшествующих им. К примеру, LQT1, связанная с *KCNQ1* сплайс-нарушенной мутацией M159sp (2-й экзон, замена нуклеотида: 477+5 Г>А), обусловлена заменой нуклеотида Г на А в интроне, 5 нуклеотидов, следующих после 2-го экзона, где 477-й нуклеотид является последним в экзоне. Такая замена приводит к нарушению процесса сплайсинга, что, в свою очередь, приводит к изменению синтезированного пептида (159-й кодон образует метионин-М) [13].

### Генетика заболевания: формы наследственности

Унаследованные вариации в геноме являются основой медицинской генетики. Реципрокные формы генетической информации, расположенные в специфических локусах (от лат. *locus* — место) внутри генома, называются аллелями [17]. К аллелям может относиться участок ДНК или даже отдельный нуклеотид. Нормальная версия генетической информации часто содержит как «нормальный» аллель, так и аллель «дикого типа». Подавляющее большинство человеческого генома представлено одиночной версией генетической информации. Молекула ДНК у одного индивида чаще всего выполнена из той же последовательности нуклеотидов, как и у другого. Однако существует ряд маленьких участков в последовательности нуклеотидов или даже один нуклеотид, которые отличаются в пределах вида. Такие нормальные вариации в отдельных локусах ДНК называются полиморфизмом. Одни полиморфизмы довольно распространенные, другие встречаются очень редко. В том случае если индивид имеет

пару идентичных аллелей — один материнский, другой отцовский, он является гомозиготным по данному аллелю. Если аллели отличаются, то человек является гетерозиготным по данному аллелю. Термины «генотип» и «фенотип» используются для обозначения соответствия участка ДНК в определенном локусе или в комбинации локусов (генотип) с клинической экспрессией данного генотипа (фенотип) на основе характерных морфологических, биохимических или молекулярных признаков.

Генетические нарушения характеризуются видом передачи в пределах семьи. Существуют четыре основных вида наследования: аутосомно-доминантный, аутосомно-рецессивный, X-сцепленный доминантный и X-сцепленный рецессивный [17]. Указанные виды наследования определяются двумя факторами: типом хромосомы (аутосомная или X-хромосома), где находится locus гена, и экспрессией фенотипа (либо в обеих хромосомах содержится рецессивный ген, либо в одной из гомологичных хромосом содержится доминантный ген).

При многих генетических заболеваниях нарушенный фенотип можно легко дифференцировать от нормального. Однако при некоторых генных нарушениях фенотип может изменяться — клиническая симптоматика может быть выраженной у одних индивидов и минимальной или практически отсутствовать у других. Под термином «пенетрантность» понимают количественный показатель фенотипической изменчивости проявления гена. Проявление гена у 100% особей с соответствующим генотипом называется полной пенетрантностью, в остальных случаях — неполной. Неполная пенетрантность свойственна проявлению многих генов человека, животных, растений и микроорганизмов. Например, некоторые наследственные болезни человека развиваются только у части лиц, в генотипе которых присутствует аномальный ген; у остальных же наследственное предрасположение к болезни остается нереализованным. Под термином «экспрессивность» понимают степень выраженности проявлений гена. Как правило, любой геноконтролируемый признак варьирует в своем проявлении. Для наследственных болезней, особенно аутосомно-доминантных, варьирование в степени выраженности каждого симптома заболевания и даже в количестве симптомов заболевания является хорошо установленным фактом из-за того, что каждый больной подвергается клиническому обследованию.

Генетические нарушения часто подразделяют на три группы: хромосомные нарушения, моногенные нарушения и мультифакторные расстройства.

### Типы мутаций при генетических заболеваниях человека

Подобно многим геномам, ДНК человека является относительно стабильной структурой, но иногда подвергается мутациям. В основном мутации делятся на три категории: геномные, хромосомные и генные [17].

Примеры нуклеотидных последовательностей:

#### *Нормальная последовательность*

|     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| ATG | CGG | TAC | GGC | ATT | GAT |
| Met | Arg | Tyr | Gly | Lle | Asp |

#### *Скрытая мутация*

|     |     |     |            |     |     |
|-----|-----|-----|------------|-----|-----|
| ATG | CGG | TAC | GGA        | ATT | GAT |
| Met | Arg | Tyr | <b>Gly</b> | Lle | Asp |

#### *Миссенс-мутация*

|     |     |     |            |     |     |
|-----|-----|-----|------------|-----|-----|
| ATG | CGG | TAC | AGG        | ATT | GAT |
| Met | Arg | Tyr | <b>Arg</b> | Lle | Asp |

#### *Нонсенс-мутация*

|     |     |             |     |     |     |
|-----|-----|-------------|-----|-----|-----|
| ATG | CGG | TAG         | GGC | ATT | GAT |
| Met | Arg | <b>Stop</b> |     |     |     |

Геномные мутации возникают при нарушении деления хромосом. Трисомия 21-й пары хромосом (синдром Дауна) может быть примером такой мутации. При хромосомных мутациях происходят крупные перестройки структуры отдельных хромосом. В этом случае наблюдаются потеря (делеция) или удвоение части (дупликация) генетического материала одной или нескольких хромосом, изменение ориентации сегментов в отдельных хромосомах (инверсия), а также перенос части генетического материала с одной хромосомы на другую (транслокация).

На генном уровне изменения первичной структуры ДНК генов под действием мутаций менее значительны, чем при хромосомных мутациях, однако генные мутации встречаются более часто. В результате генных мутаций происходят замены, делеции и вставки одного или нескольких нуклеотидов, транслокации, дупликации и инверсии различных частей гена. В том случае, когда под действием мутации изменяется лишь один нуклеотид, говорят о точечных мутациях. Все точечные мутации с заменой оснований разделяют на два класса: транзиции (замена пурина на пурин или пиримидина на пиримидин) и трансверсии (замена пурина на пиримидин или наоборот). Возможны четыре генетических последствия точечных мутаций: 1) сохранение смысла кодона из-за вырожденности генетического кода (синонимическая замена нуклеотида); 2) изменение смысла кодона, приводящее к замене аминокислоты в соответствующем месте полипептидной цепи (миссенс-мутация); 3) образование бессмысленного кодона с преждевремен-

ной терминацией (нонсенс-мутация); 4) обратная замена (стоп-кодона на смысловой кодон).

### **Техника, используемая при генетическом тестировании**

Для проведения генетического тестирования необходимо выполнить забор 5–15 мл венозной крови, которая должна быть помещена в контейнер с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА). Существуют также методы забора ДНК из материала слюны или соскоба слизистой щеки, которые чаще используются для определения родства в пределах семьи. Однако последний часто не удовлетворяет всем требованиям генетического тестирования, при котором надо провести тщательный анализ возникших мутаций. К примеру, генетическое тестирование врожденного синдрома удлиненного интервала *Q–T* или синдрома Бругада возможно только на основе исследования ДНК материала крови [15]. Молекула ДНК может быть выделена и из замороженных тканей. Для этого можно использовать ткань из миокарда левого желудочка, а также из других органов (печени, селезенки, тимуса), имеющих высокое соотношение показателя ядро/цитоплазма.

### **Полимеразная цепная реакция**

Идентифицировать генные мутации возможно с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Метод основан на многократном избирательном копировании определенного участка ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*). При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце. В отличие от амплификации ДНК в живых организмах (репликации), с помощью ПЦР амплифицируются относительно короткие участки ДНК. В обычном ПЦР-процессе длина копируемых ДНК-участков составляет не более 3000 пар оснований. С помощью смеси различных полимераз, с использованием добавок и при определенных условиях длина ПЦР-фрагмента может достигать 20–40 тыс. пар нуклеотидов.

Специфичность ПЦР основана на образовании комплементарных комплексов между матрицей и праймерами, короткими синтетическими олигонуклеотидами длиной 18–30 оснований. Каждый из праймеров комплементарен одной из цепей матрицы и ограничивает начало и конец амплифицируемого участка.

Полимеразную цепную реакцию проводят в амплификаторе — приборе, обеспечивающем периодическое охлаждение и нагревание пробирок, обычно с точностью не менее 0,1 °C. Двухцепочеч-

ную ДНК-матрицу нагревают до 94–96 °C, чтобы цепи ДНК разошлись. Эта стадия называется денатурацией, так как разрушаются водородные связи между двумя цепями ДНК. Когда цепи разойдутся, температуру понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей. Эта стадия называется отжигом. ДНК-полимераза реплицирует матричную цепь, используя праймер в качестве затравки. Это стадия элонгации. Полимераза начинает синтез второй цепи. При хорошо отлаженном процессе с помощью ПЦР можно синтезировать миллионы копий определенного участка ДНК, которые далее можно использовать для исследований.

### **Промежуточное выявление мутаций: денатурирующая высокоэффективная жидкостная хроматография**

Как правило, после ПЦР следует промежуточное исследование для выявления мутаций — высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЖХ). Эта методика позволяет исследователю ответить на вопрос: есть ДНК с измененной последовательностью нуклеотидов в образце или нет? На сегодняшний день ВЖХ является одним из самых чувствительных методов выявления неизвестных генных мутаций [8, 10]. Денатурирующая ВЖХ (дВЖХ) представляет собой анализ ПЦР-продуктов с помощью ионпарной обращенно-фазовой хроматографии на колонках, содержащих алкилированные непористые частицы. При применении градиента ацетонитрила и частичной тепловой денатурации гетеродуплексы демонстрируют повышенное время удерживания по сравнению с гомодуплексами «дикого» типа. Чувствительность дВЖХ существенно не меняется при размерах фрагментов от 150 до 700 пар оснований в случае высокой специфичности. Важным является тот факт, что сегодня существуют компьютерные программы, которые могут предсказывать соответствующие условия (температуру, концентрацию ацетонитрила) для определенных нуклеотидных последовательностей при определении гетеродуплексов.

### **Прямое секвенирование**

Существует только один способ точного определения генетических мутаций — секвенирование целого гена [1, 2]. Для этого используют два метода: дидезокси- и пиросеквенирование.

#### **Дидезоксисеквенирование**

Дидезоксисеквенирование основано на синтезе ДНК, который происходит в присутствии смеси дезокси- и дидезоксинуклеотидов (ддНТФ). Когда ддНТФ случайно включаются в растущую цепь ДНК, они приводят к появлению амплифициро-

ванных продуктов с окончаниями различной длины. Такие предварительно оконченные фрагменты анализируют с помощью электрофореза и регистрируют вручную или, если ддНТФ соединены с флуорохромом, автоматически методом капиллярного электрофореза.

Дидезоксисеквенирование было использовано для секвенирования различных бактериальных и эукариотических геномов, а также генома человека. Секвенирование является единственным достоверным методом идентификации неохарактеризованных нуклеотидных нарушений, позволяющим впоследствии определить несвоевременные стоп-кодоны, миссенсы или молчащие мутации. При X-сцепленных заболеваниях важно выявление в семье женщин-носителей мутаций, что необходимо для генетического консультирования. Внедрение новых достижений химии красителей намного облегчает процесс выявления таких носителей.

Основной недостаток метода заключается в его стоимости, но применение новых флуорохромных технологий существенно ее снижает. Все меньшие количества метки применяются для определения последовательности образца. Секвенирование может сочетаться с технологиями скрининга. Однако недостаток лабораторий, имеющих соответствующее оборудование, существенно ограничивает использование этого подхода.

Как и при применении других методов, возможно получение ложноположительных вариаций последовательностей исследуемого гена во время ПЦР-амплификации. Риск подобной ошибки снижается при использовании доступных сегодня полимераз, отличающихся высоким качеством считывания и низкой частотой ошибок. В дополнение к этому мутации в продуктах ПЦР должны быть подтверждены альтернативными методами: рестрикционным ферментативным анализом или аллельспецифичной ПЦР.

### **Пиросеквенирование**

Пиросеквенирование представляет собой метод определения высвобождающейся в ходе синтеза ДНК молекулы пирофосфата. В результате серии четырех ферментативных реакций образуется видимый свет, интенсивность которого пропорциональна количеству включенных в цепь нуклеотидов. Каскад начинается с реакции полимеризации нуклеиновой кислоты, в которой высвобождается неорганический пирофосфат в результате включения нуклеотидов в цепь ДНК-полимеразой. Высвобожденный пирофосфат превращается затем в АТФ, который способствует свечению. Так как нуклеотиды добавляют пошагово, а их последовательность известна, можно определить их последовательность и в матрице.

## **Генетическое тестирование при нарушениях электрофизиологии сердца и внезапной сердечной смерти**

Изучение сердечных каналопатий является относительно новым направлением в области аритмологии. В 1995 г. была впервые выявлена непосредственная причина возникновения врожденного синдрома удлиненного интервала  $Q-T$  — изменение функционирования сердечных каналов [5, 18]. Впоследствии было выяснено, что причинами специфических каналопатий также являются синдром укороченного интервала  $Q-T$ , синдром Бругада, синдром Тимоти, катехоламининдуцированная полиморфная желудочковая тахикардия, семейные формы атриовентрикулярной блокады и фибрилляции предсердий, идиопатическая фибрилляция желудочков, а также некоторые редкие формы внезапной сердечной смерти. В течение последнего десятилетия по всему миру начали активно выполнять генетические тестирования для выявления сердечных каналопатий. Такие генетические тестирования во многом были направлены на изучение генетического и фенотипического соотношения, что оказалось очень важным для уточнения диагнозов, определения степени риска и назначения эффективного лечения для пациентов. Была выявлена клиническая и генетическая гетерогенность основных механизмов и причин развития болезней. Как было установлено, каждая разновидность каналопатий состоит из множества генетических форм, которые проявляются со специфической клиникой. Например, синдром удлиненного интервала  $Q-T$ , который изначально казался однотипным расстройством, имеет много вариантов клинического проявления, отличающихся показателями интервала  $Q-T$  на поверхностной электрокардиограмме у разных больных, которые имеют различную интенсивность течения, прогноз и часто требуют различного лечения [7].

### **Преимущества генетического тестирования в условиях кардиологической практики**

С помощью генетического теста можно выявить точные молекулярные изменения, которые лежат в основе каналопатий, а также установить точную молекулярную структуру для диагностики разных форм, например синдрома удлиненного интервала  $Q-T$  [17], подтверждающие или исключающие наличие мутаций, обуславливающих болезнь до появления симптомов у данных больных [13], и при определении точного генотипа каналопатии дать рекомендации по лечению данным пациентам [9, 14].

### Текущие ограничения генетического тестирования для выявления аритмий

Клиническое генетическое исследование становится все более доступным для всех наследственно обусловленных аритмий. Так, в случае СУИ  $Q-T$  примерно 25% семей, где с большой вероятностью имеются симптомы СУИ  $Q-T$ , будут иметь отрицательные результаты генетического тестирования. Потому очень важно понимать, что отрицательный результат теста не может полностью исключить диагноз. Однако когда имеются клинические проявления, то тогда отрицательный результат генетического тестирования может быть использован как метод исследования, исключающий данный диагноз. Синдром Бругада можно выявить при определении одного гена — *SCN5A*. Однако *SCN5A* является находкой лишь в 20% семей, заболевание членов которых соответствует диагнозу синдрома Бругада. Хотя *KCNJ2* обуславливает более половины случаев синдрома Андерсена–Тавила и RvR2-мутация также обуславливает более 50% случаев катехоламинообусловленной полиморфной желудочковой тахикардии, данные тесты производятся более в научно-исследовательских целях, хотя коммерческое использование этого теста тоже доступно.

### Кому показано пройти генетическое тестирование?

Все пациенты и члены их семей, у которых есть клинические проявления патологии каналовцев кардиомиоцитов, должны пройти генетическое исследование в зависимости от предполагаемого диагноза. С клинической точки зрения пациенту с подозрением на СУИ  $Q-T$  и его родственникам первой линии также необходимо предложить генетический тест. Оправдано применение генетического исследования у пациентов с необъяснимыми обмороками или с удлинением интервала  $Q-T$  под влиянием медикаментозных средств, которые, однако, не отвечают всем диагностическим критериям. Пациенты с подозрением на синдром Бругада могут проходить генетическое исследование несколько раз, потому что только в 20% случаев подтверждается диагноз. Кроме того пациентам из семей, где имеются случаи внезапной смерти, также необходимо пройти генетический скрининг [15].

### Интерпретация результатов генетического исследования

У пациентов с подозрением на патологию каналовцев кардиомиоцитов результаты генетического исследования должны быть интерпретированы с большой осторожностью. Определение варианта патологии требует особого внимания со стороны врача. Если у кардиолога недостаточно знаний

для понимания данной патологии, он может быть проинформирован генетиком. Семейный анамнез как минимум у трех поколений требует тщательного генетического обследования. Поскольку существует множество генотипов-фенотипов, то в основном данными пациентами следует заниматься кардиологу, который должен нести ответственность за вторичную профилактику.

### Этические, правовые и социальные аспекты

Пациента необходимо хорошо информировать о последствиях генетического тестирования. Должна быть полная ясность в отношении смысла проведения генетического скрининга. Необходимо заранее обсудить с пациентом круг лиц, имеющих доступ к результатам генетического тестирования. Генетическая информация должна восприниматься как личная и частная информация [6, 16]. Раскрытие информации третьей стороне (например страховой компании или работодателю) может иметь последствия для пациента в виде генетической дискриминации. Законодательство защищает пациентов от возможного использования генетической информации.

Генетическое обследование — это индивидуальное решение [19]. Хотя генетические исследования проводят изолированно от личности человека, решение пройти генетическое тестирование может иметь далеко идущие последствия для других членов семьи. При положительном результате необходимо информировать лиц с генетической предрасположенностью к данному заболеванию, которые потенциально подвержены риску внезапной сердечной смерти. Генетические методы исследования позволяют повысить психологическое благополучие и более глубоко осознать необходимость профилактического лечения, вследствие чего риски могут быть минимизированы. Однако результаты генетического тестирования могут вызвать депрессию, беспокойство, чувство вины, осуждения, дискриминацию семьи.

### Заключение

Достижения в области молекулярной медицины помогают в изучении основы электрофизиологических нарушений сердца. Сегодня активно продолжается поиск новых методов генетического исследования.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Ackerman, M. J. Ethnic differences in cardiac potassium channel variants: implications for genetic susceptibility to sudden cardiac death and genetic testing for congenital long  $Q-T$  syndrome / M. J. Ackerman, D. J. Tester, G. S. Jones et al. // Mayo Clinic. Proc. — 2003. — Vol. 78, № 12. — P. 1479–1487.
2. Ackerman, M. J. Spectrum and prevalence of cardiac sodium channel variants among black, white, Asian, and Hispanic individuals: implications for arrhythmogenic susceptibility and

- Brugada/long  $Q-T$  syndrome genetic testing / M. J. Ackerman, I. Splawski, J. C. Makielski et al. // Heart Rhythm. — 2004. — Vol. 1, № 5. — P. 600–607.
3. Baird, P. A. Genetic disorders in children and young adults: a population study / P. A. Baird, T. W. Anderson, H. B. Newcombe, R. B. Lowry // Amer. J. Hum. Genet. — 1988. — Vol. 42, № 5. — P. 677–693.
4. Constantin, C. M. A primer on genetic testing / C. M. Constantin, A. Faucett, I. M. Lubin // J. Midwifery Womens Health. — 2005. — Vol. 50, № 3. — P. 197–204.
5. Curran, M. E. A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long  $Q-T$  syndrome / M. E. Curran, I. Splawski, K. W. Timothy et al. // Cell. — 1995. — Vol. 80, № 5. — P. 795–803.
6. Lea, D. H. Ethical issues in genetic testing / D. H. Lea, J. Williams, M. P. Donahue // J. Midwifery Womens Health. — 2005. — Vol. 50, № 3. — P. 234–240.
7. Napolitano, C. Gene-specific therapy for inherited arrhythmogenic diseases / C. Napolitano, R. Bloise, S. G. Priori // Pharmacol. Ther. — 2006. — Vol. 110, № 1. — P. 1–13.
8. Ning, L. Denaturing highperformance liquid chromatography quickly and reliably detects cardiac ion channel mutations in long  $Q-T$  syndrome / L. Ning, A. Moss, W. Zareba et al. // Genet. Test. — 2003. — Vol. 7, № 3. — P. 249–253.
9. Priori, S. G. Role of genetic analyses in cardiology. Part I. Mendelian diseases: cardiac channelopathies / S. G. Priori, C. Napolitano // Circulation. — 2006. — Vol. 113, № 8. — P. 1130–1135.
10. Spiegelman, J. I. High accuracy DNA sequence variation screening by DHPLC / J. I. Spiegelman, M. N. Mindrinos, P. J. Oefner // BioTechniques. — 2000. — Vol. 29, № 5. — P. 1084–1092.
11. Strachan, T. Human Molecular Genetics / T. Strachan, A. Read. — New York: Wiley-Liss, 1999.
12. Tester, D. J. Allelic dropout in long  $Q-T$  syndrome genetic testing: a possible mechanism underlying false negative results / D. J. Tester, L. B. Cronk, J. L. Carr et al. // Heart Rhythm. — 2006. — Vol. 3, № 7. — P. 815–821.
13. Tester, D. J. Compendium of cardiac channel mutations in 541 consecutive unrelated patients referred for long  $Q-T$  syndrome genetic testing / D. J. Tester, M. L. Will, C. M. Haglund, M. J. Ackerman // Heart Rhythm. — 2005. — Vol. 2, № 5. — P. 507–517.
14. Tester, D. J. Genetic testing for cardiac channelopathies: ten questions regarding clinical considerations for heart rhythm allied professionals / D. J. Tester, M. J. Ackerman // Heart Rhythm. — 2005. — Vol. 2, № 6. — P. 675–677.
15. Tester, D. J. The role of molecular autopsy in unexplained sudden cardiac death / D. J. Tester, M. J. Ackerman // Curr. Opin. Cardiol. — 2006. — Vol. 21, № 3. — P. 166–172.
16. Thomas, S. M. Society and ethics — the genetics of disease / S. M. Thomas // Curr. Opin. Genet. Dev. — 2004. — Vol. 14, № 3. — P. 287–291.
17. Thompson and Thompson Genetics in Medicine / Eds R. L. Nusbaum, R. R. McInnes, H. F. Willard. — Philadelphia, PA: W. B. Saunders Co, 2001.
18. Wang, Q. Cardiac sodium channel mutations in patients with long  $Q-T$  syndrome, an inherited cardiac arrhythmia / Q. Wang, J. Shen, Z. Li et al. // Hum. Mol. Genet. — 1995. — Vol. 4, № 9. — P. 1603–1607.
19. Van Riper, M. Genetic testing and the family / M. Van Riper // J. Midwifery Womens Health. — 2005. — Vol. 50, № 3. — P. 227–233.

Поступила 07.12.2010

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2010

УДК 616.12-008.318:612.172.2-008.6

## СИНДРОМ УКОРОЧЕННОГО ИНТЕРВАЛА $Q-T$

Л. А. Бокерия\*, О. Л. Бокерия, К. А. Калысов

Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А. Н. Бакулева (дир. — академик РАМН Л. А. Бокерия)  
РАМН, Москва

Связь между измененным интервалом  $Q-T$  и внезапной сердечной смертью (ВСС) известна уже более 50 лет, но лишь недавно стало ясно, что не только удлинение интервала  $Q-T$ , но и его укорочение может быть предиктором ВСС [26]. Синдром удлиненного интервала  $Q-T$  — наследственное заболевание с повышенным риском ВСС [3]. Ранее считалось, что укорочение интервала  $Q-T$  обусловлено гиперкальциемией, и не было данных, указывающих на корреляцию между этим синдромом и жизнеугрожающими аритмиями [4]. И только в 2000 г. появились описания отдельных семейных случаев связи укороченного интервала  $Q-T$  и ВСС у пациентов с пароксизмальной формой фибрилляции предсердий (ФП) [16].

Данный синдром обычно возникает у молодых людей без сопутствующей сердечно-сосудистой па-

тологии и повышает риск развития аритмий и ВСС. Проведенные генетические и электрофизиологические исследования у пациентов показали, что существует связь укороченного интервала  $Q-T$  с мутацией в генах, отвечающих за функционирование калиевых каналов. При ускорении тока калия через данные каналы происходит укорочение рефрактерного периода, что повышает риск возникновения ФП и/или фибрилляции желудочков (ФЖ).

Первое исследование, посвященное синдрому укороченного интервала  $Q-T$  (short  $Q-T$  syndrome — SQTS), провели в 1993 г. A. Algra и соавт. [4]. В исследование были включены 6693 пациента, которые наблюдались в течение двух лет. Всем больным проводилось холтеровское мониторирование ЭКГ. Исследуемые были разделены на две группы: в первую группу вошли пациенты с корригированным

\* Адрес для переписки: e-mail: leon@online.ru