

© Т. Э. Иващенко

НИИ акушерства и гинекологии
им. Д. О. Отта РАМН:
Санкт-Петербург

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА МОНОГЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ В ФМГЦ ГУ НИИ АКУШЕРСТВА И ГИНЕКОЛОГИИ им. Д. О. ОТТА РАМН

■ В обзоре рассмотрены основные подходы, используемые при диагностике моногенных болезней. Дана краткая характеристика молекулярных основ наиболее частых заболеваний. Подведены итоги работы по ДНК-диагностике моногенных болезней, проведенной в лаборатории пренатальной диагностики наследственных болезней НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН за 20 лет.

■ **Ключевые слова:** моногенные заболевания; молекулярная диагностика; пренатальная диагностика

Введение

На долю генных нарушений приходится в общей сложности до 5 % всей врожденной патологии [1]. Из них собственно моногенные болезни составляют около 1 %. Для пренатальной диагностики (ПД), в первую очередь, представляют интерес моногенные болезни, приводящие к тяжелой, нередко смертельной патологии, в отношении которых пока отсутствуют или все еще малодоступны методы лекарственной терапии. Из более 6 000 заболеваний, известных на сегодняшний день, доля заболеваний, безусловно заслуживающих ПД, не превышает 1 % [15]. Более половины случаев моногенной патологии, требующей ПД, составляют такие сравнительно частые и тяжелые болезни, как муковисцидоз, миодистрофия Дюшенна, синдром ломкой (фрагильной) X-хромосомы, гемофилия А и В, фенилкетонурия, атаксия Фридрейха, спинально-мышечная атрофия, врожденная вирилизующая гиперплазия коры надпочечников, или адреногенитальный синдром, и некоторые другие. ПД именно этих социально значимых моногенных заболеваний является особенно актуальной.

Основные подходы в пренатальной диагностике моногенных болезней

Основой методов ДНК-диагностики, направленных на идентификацию мутаций или молекулярное маркирование мутантных хромосом, является полимеразная цепная реакция синтеза ДНК (ПЦР). Исторически более ранний метод блот-гибридизации по Саузерну в значительной мере утратил свои приоритеты, хотя и используется до настоящего времени для идентификации некоторых мутаций.

В настоящее время в ПД, как и вообще в диагностике генных болезней, существуют два основных подхода:

- прямая диагностика, основанная на непосредственной идентификации мутаций в определенном гене;
- косвенная (непрямая) диагностика, в основе которой лежит маркирование мутантного гена (иногда называемая маркированием «больной» хромосомы, несущей мутантный ген) с помощью молекулярных маркеров [5].

Основу прямой диагностики составляет идентификация мутаций в самом гене. Преимущества метода — высокая (приближающаяся к 100 %) точность диагностики, возможность ПД, при предварительном типировании мутаций в семье только при обследовании родителей, без анализа образца больного, а также выявление гетерозиготных носителей. Недостаток метода — при отсутствии мажорных мутаций гена требуется детальный молекулярный анализ первичной структуры гена с целью обнаружения мутаций в конкретной семье или у больного ребенка.

Непрямой (косвенный) подход в молекулярной диагностике исторически более ранний и более универсальный. Он основан

на анализе полиморфных сайтов ДНК, которые могут располагаться либо внутри самого мутантного гена, либо находиться в непосредственной близости от него. Основное преимущество косвенного метода — возможность ДНК-диагностики без точной идентификации мутаций в самом гене и даже при отсутствии данных о точной идентификации и клонировании самого мутантного гена. Его существенными недостатками являются невозможность диагностики при отсутствии больного ребенка (нельзя точно определить с каким полиморфным аллелем сцеплен мутантный ген) и вероятность ошибки диагностики в связи с возможностью кроссинговера в мейозе и переноса полиморфного сайта на здоровый аллель [3].

Достоверность молекулярной диагностики прямым методом, т. е. путем идентификации мутаций в самом гене, очень высока и приближается к абсолютной. Несмотря на такую точность, учитывая все многообразие возможных изменений в геноме при созревании гамет (кроссинговер) и на начальных стадиях эмбриогенеза (мутагенный эффект), более оправданной является точность диагностики около 99,9 %. Значительно сложнее оценка результатов молекулярной диагностики косвенным методом. В случае учета внутригенных полиморфизмов точность непрямой диагностики достаточно высока, так как величина внутригенного кроссинговера, как правило, не превышает 0,1 % для большинства известных генов. Исключение могут составлять только сравнительно крупные гены, такие как ген дистрофина, фактора 8, нейрофиброматоза и некоторые другие.

Основные принципы пренатальной диагностики генных болезней

Принимая во внимание высокую точность молекулярных методов, их большую чувствительность необходимо помнить, что эффективность ДНК-диагностики у плода в значительной мере требует соблюдения следующих основных требований:

- точность клинического диагноза;
- своевременное ДНК-обследование семьи высокого риска и больного;
- правильность оценки риска рождения больного ребенка;
- выбор оптимального срока ПД;
- возможность получения материала плода;
- четкость рекомендаций после ПД.

Моногенные наследственные болезни, диагностируемые пренатально

Муковисцидоз (МВ) (кистозный фиброз поджелудочной железы) — наиболее распространенное тяжелое моногенное заболевание, наследуемое по аутосомно-рецессивному типу. Частота

заболевания в разных популяциях, нациях и этнических группах существенно варьирует, составляя в среднем 1 на 2000–2500 новорожденных у представителей белой расы.

Ген МВ картирован на длинном плече хромосомы 7 (7q31.1) в 1985 году. В конце 1989 года идентифицирован сам ген МВ. Охарактеризован белковый продукт этого гена, получивший название «трансмембранный регуляторный белок муковисцидоза» (CFTR) и выявлена наиболее частая мутация — делеция фенилаланина в 508 положении аминокислотной последовательности белка (delF508), приводящая к этому заболеванию [11–13]. Помимо делеции в гене CFTR обнаружено множество других мутаций. В отличие от delF508, подавляющее большинство из них представлено спорадическими случаями, т. е. встречается достаточно редко. К концу 2006 года в гене CFTR идентифицированы более 1500 точечных мутаций, несколько делеций и дупликаций.

К диагностически значимым мутациям, приводящим к МВ в России, помимо delF508 (54 %) можно отнести мутации 394delTT, G542X, 2143delT, 2184insA, W1282X, N1303K, 3737delA, CFTRdel21kb, частота которых превышает 2 %. Анализ всего лишь 5 мутаций гена CFTR (394delTT, delF508, CFTRdel21kb, 2184insA, 2143delT) позволяет идентифицировать до 70 % всех мутантных хромосом у больных МВ в России [4].

На основе полученных данных о частотах и спектре мутаций гена CFTR у больных МВ в России, а также ДНК-полиморфизмов в различных популяциях и у больных муковисцидозом, разработан оптимальный алгоритм ПД МВ в семьях высокого риска. Данный алгоритм содержит три основных этапа. На 1-м этапе отрабатываются варианты наиболее простой и надежной прямой молекулярной диагностики (идентификация мутаций), на следующем (при наличии больного ребенка и отсутствии идентифицируемых мутаций) — варианты косвенной диагностики и, наконец, на 3-м (если семья полностью неинформативна для ДНК-диагностики) — проводится биохимическая диагностика по активности ферментов микроворсинок кишечника плода в амниотической жидкости. Данная схема с использованием комплексного подхода и применением всего спектра методов как молекулярных, так и биохимических, позволяет провести ПД практически на любой стадии внутриутробного развития плода.

Миодистрофия Дюшенна–Беккера — сцепленная с полом мышечная дистрофия. Частота заболевания составляет 1 на 5000 новорожденных мальчиков. Выделяют две клинические формы заболевания: тяжелую — миодистрофию Дюшенна

(МД) и гораздо более мягкую — миодистрофию Беккера (МБ).

Ген миодистрофии Дюшенна (**DMD**) — самый крупный из известных генов человека, картирован на коротком плече X-хромосомы в области Xp21. Ген *DMD* кодирует белок дистрофин, входящий в состав сарколеммы мышечного волокна. При МД дистрофин либо полностью отсутствует, либо деградирует вскоре после синтеза. При МБ, как правило, дистрофин присутствует, хотя и в измененном, чаще всего — укороченном варианте. В 68 % случаев в гене *DMD* у больных мальчиков обнаруживаются протяженные делеции, захватывающие от одного до нескольких соседних экзонов. Делеции обычно локализованы в двух «горячих» районах — в области 5'-конца гена (экзоны 6–19) и в 3'-конце (экзоны 40–53). При этом 30 % делеций встречаются в проксимальной части гена и 70 % — в дистальной [3].

Разработаны эффективные методы диагностики делеций в *DMD*-гене, основанные на использовании мультиплексной ПЦР. Одновременное тестирование 18 экзонов и промоторной части гена позволяет выявить до 98 % всех крупных делеций. При отсутствии идентифицируемой делеции применяют косвенный метод ДНК-диагностики с использованием внутригенных полиморфных сайтов: pERT87-8/TaqI, pERT87-15/BamHI, 124/PstI, 16intron/TaqI и аллельных вариантов динуклеотидных СА-повторов в интронах 49 и 50 — STR-49, STR-50, однако при этом точность диагностики снижается с 99 до 94 % [9, 10].

Гемофилия А — сцепленное с полом заболевание, вызванное наследственным дефектом фактора VIII, важнейшего звена в системе свертывания крови. Комплекс фактора VIII с молекулярной массой более 1 млн дальтон состоит из двух компонентов. Главный компонент — FVIIIС кодируется геном *F8C*, локализованным в X-хромосоме. С VIIIС нековалентно связан фактор Виллебранда — FVIIIР, кодирующийся аутосомным геном. Фактор Виллебранда стабилизирует фактор VIII и регулирует его активность.

Ген *F8C* — один из наиболее протяженных генов человека; содержит 26 экзонов размером от 69 до 3106 нуклеотидов. Общая длина интронов составляет 177 kb; около 20 % этой ДНК приходится на интрон 22 (32,4 kb).

Изолированные случаи гемофилии А составляют 30 %, 70 % — семейные варианты. Около 10 % всех идентифицированных мутаций в гене *F8* являются делециями одного или нескольких смежных экзонов. Примерно 5 % всех мутаций составляют короткие делеции и дубликации гена, остальные мутации — точковые замены. Для подавляющего большинства мутаций гена *F8C*

характерно практически полное отсутствие «горячих» точек: каждая семья высокого риска по гемофилии А имеет свою собственную мутацию. Исключение составляет группа протяженных инверсий интрона 22, захватывающих экзоны 1–22 и полностью блокирующих функцию гена. Такие инверсии, как оказалось, присутствуют в 45 % семей с тяжелой формой гемофилии А [14].

Прямая диагностика протяженных инверсий в гене *F8* осуществляется методом блот-гибридизации с ДНК-зондом p482.6 после рестрикции суммарной геномной ДНК эндонуклеазами BclI, DraI, NcoI. В остальных случаях, в силу отсутствия мажорных мутаций в гене *F8C*, чаще всего используют косвенные методы молекулярной диагностики. С помощью ПЦР анализируют полиморфные динуклеотидные СА-повторы экзона 13, Hind III полиморфизм в интроне 19, HbaI полиморфизм в интроне 22 и внегенный полиморфизм локуса DXS52 (St14/TaqI) [8].

Фенилкетонурия (**ФКУ**) — одно из наиболее частых аутосомно-рецессивных заболеваний, обусловленных наследственным дефектом фенилаланин-гидроксилазы, приводящим при отсутствии своевременной терапии к тяжелой умственной отсталости. В России частота заболевания колеблется в пределах 1 на 8000–10 000 новорожденных.

Гидроксилирование фенилаланина является достаточно сложным процессом, в котором участвуют, по крайней мере, 3 фермента. Фенилаланин-гидроксилаза (**РАН**), гомополимерный фермент, состоящий из субъединиц с молекулярной массой 52 кДа, продуцируется клетками печени и регулирует превращение L-фенилаланина в L-тирозин. Его дефицит приводит к накоплению фенилаланина в сыворотке крови. Гиперфенилаланинемия может возникать также при дефиците дигидроптеридин-редуктазы и при дефектах синтеза биоптерина. Однако эти заболевания, хотя и сопровождаются снижением активности РАН, значительно отличаются от классической ФКУ и не корректируются диетой, лишенной фенилаланина.

Ген *РАН* транскрибируется в гепатоцитах с образованием мРНК размером 2,4 kb. Наиболее распространенный тип мутаций — однонуклеотидные замены (миссенс-, нонсенс-мутации и мутации в сайтах сплайсинга). Крупных структурных перестроек в гене *РАН* не найдено, хотя иногда встречаются однонуклеотидные делеции.

Отмечен неравномерный характер внутригенной локализации мутаций. Так, наибольшее число миссенс-мутаций встречается в центральной части гена: в экзоне 7, а также в экзонах 9 и 12. Преимущественный район локализации делеций — экзоны 1, 2 и 3. Наиболее частой мажорной мутацией в гене *РАН* является мутация R408Q, ко-

торая, по нашим данным, встречается с частотой 45 % [3].

В медицинской практике используется как прямая, так и косвенная диагностика мутаций в РАН-гене. При анализе семьи, в которой отсутствуют легко идентифицируемые прямыми методами мутации, молекулярная диагностика может быть проведена с помощью внутригенных полиморфных сайтов рестрикции. Удобен, в частности, Msp1-полиморфизм в 8-м экзоне, анализ которого может быть осуществлен методом ПЦР/рестрикции. В последнее время появились данные о наличии высокополиморфных сайтов внутри интронов гена РАН, которые оказались особенно удобными для молекулярного маркирования мутантных аллелей. Данные полиморфные маркеры в настоящее время активно используются как для диагностики ФКУ, так и для ПД этого тяжелого заболевания.

Врожденная гиперплазия коры надпочечников (**ВГКН**), или адреногенитальный синдром, является клиническим синдромом, развитие которого связано с нарушением секреции кортикостероидов вследствие врожденного дефекта ферментов, ответственных за биосинтез этих гормонов. В 95 % случаев ВГКН является результатом дефицита фермента 21-гидроксилазы (цитохром P-450c21).

По своим клиническим проявлениям данное заболевание весьма разнообразно. Известны две классические формы ВГКН: сольтерияющая (**СТФ**) и простая вирильная (**ПФ**), и одна неклассическая форма (**НФ**). Частота «классических» форм составляет 1:10 000 новорожденных, «неклассической» — около 1 % в популяции. Наиболее тяжелой является сольтерияющая форма, которая проявляется в нарушении солевого обмена, гипонатриемией и гиперкалиемией, что, в свою очередь, обусловлено нарушением способности почек к реабсорбции ионов натрия. В основе этого лежит полная утрата ферментативной активности 21-гидроксилазы, что, при отсутствии адекватного лечения, может приводить к летальному исходу.

При простой вирильной форме в организме не синтезируется достаточное количество кортизола. При этом накопившиеся предшественники кортизола: 17-гидроксипрогестерон, прегненолон, 17-гидроксипрегненолон и прогестерон в сетчатом слое коры надпочечников конвертируются в надпочечниковые андрогены, поэтому ПФ характеризуется прогрессирующей вирилизацией и ускоренным соматическим развитием. Пониженная концентрация кортизола в крови стимулирует синтез кортиколиберина гипоталамусом, что, в свою очередь, ведет к повышенной секреции АКТГ и, следовательно, к гиперплазии коры надпочечников.

Третья, неклассическая, форма — наиболее легкая, по сравнению с остальными, проявляется, главным образом, в подростковом возрасте, в период полового созревания. У пациентов наряду с различными клиническими проявлениями наблюдается умеренное повышение в сыворотке крови уровня 17-гидроксипрогестерона.

Нарушения в работе фермента 21-гидроксилазы возникают в результате различных мутационных повреждений в гене *CYP21B*, кодирующем данный фермент. Ген 21-гидроксилазы картирован на коротком плече хромосомы 6 (участок 6p21.3). Сложность молекулярной диагностики при ВГКН в том, что в данном локусе на самом деле находятся не один, а два, tandemно расположенных гена — функционально активный ген *CYP21B* и его неактивная копия (псевдоген) — *CYP21A*. Последний неактивен из-за присутствия в его последовательности нескольких «тяжелых» мутаций (делеция в 3-м экзоне, инсерция со сдвигом рамки считывания в 7-м экзоне и нонсенс-мутация — в 8-м экзоне). Наличие рядом с кодирующим геном гомологичной ДНК последовательности псевдогена зачастую ведет к нарушениям спаривания хромосом в мейозе и, как следствие этого, к конверсии генов (перемещение фрагмента активного гена на псевдоген), либо к делеции части смыслового гена.

Делеция гена является одним из наиболее частых нарушений в гене *CYP21B*, особенно при сольтерияющей и простой вирильной формах ВГКН. Многими зарубежными и отечественными авторами [7, 16, 18] показано, что для каждой клинической формы ВГКН характерен свой спектр диагностически значимых мутаций.

Исходя из вышесказанного, разработана оптимальная схема обследования пациентов с ВГКН: на первом этапе проводится детекция мутаций, соответствующих клинической форме заболевания. На втором этапе необходимо проводить исследование гена на наличие сопутствующих мутаций, возникающих в результате рекомбинационных событий. Такой алгоритм применим и при проведении пренатальной диагностики в семьях высокого риска ВГКН. Важно отметить, что исследование ДНК плода не должно ограничиваться детекцией только тех мутаций, которые были идентифицированы у родителей пробанда. Необходимо иметь представление о гене целиком, чтобы по возможности исключить возникновение мутаций *de novo* [7].

Спинальная мышечная атрофия (**СМА**) является одним из наиболее распространенных летальных рецессивных наследственных нейромышечных заболеваний. В европейских популяциях данная патология встречается с частотой

1 на 10 000 новорожденных. По тяжести клинических проявлений СМА подразделяют на три типа: I — острая форма (болезнь Верднига–Гоффмана), II — средняя (промежуточная) форма с летальным исходом после двух лет; III — хроническая форма (болезнь Кугельберга–Веландера). В большинстве случаев причиной СМА являются мутации в гене выживания моторных нейронов — *SMN1* (98 %). У 95 % пациентов с СМА основным типом мутаций являются делеции в гене *SMN1*.

Ген *SMN1* локализован на длинном плече хромосомы 5. Рядом с ним расположен функционально неактивный псевдоген (*SMN2*). Ген *SMN1* отличается от своей центромерно расположенной копии (*SMN2*) восьмью нуклеотидами, пять из которых находятся в интронах и три — в экзонах 6, 7 и 8. Известно, что протяженные делеции, захватывающие ген *SMN1* и *NAIP*, существенно повышают риск развития тяжелой формы спинальной мышечной атрофии. У пациентов со спинальной мышечной атрофией типа I и II ген *NAIP* отсутствует в 12–18 % случаев.

Сравнительный анализ частот гомозигот по делеции гена *SMN1* среди пациентов с СМА показывает, что высокий уровень делеций в этом гене характерен для больных СМА Северо-Западного региона России так же, как и для пациентов со СМА Евразии [2]. Рядом зарубежных авторов показано, что в 30 % случаев мутации в гене *SMN1* являются результатом конверсионных преобразований. Конверсионные преобразования достаточно трудно идентифицировать, и нередко при образовании таких химерных генов результаты исследований интерпретируются как делеции, хотя фактически они являются продуктом конверсии (внутригенных перемещений фрагментов ДНК).

Учитывая значительную клиническую гетерогенность СМА, диагностика заболевания должна проводиться особенно тщательно. Необходимо проводить анализ не только на наличие простых делеций, но и конверсионных изменений, которые составляют до 30 % мутационных повреждений *SMN* региона.

На основе собственных данных предложен алгоритм диагностики СМА с учетом анализа конверсий. Алгоритм включает следующие этапы:

- I. ПЦР-анализ экзонов 7 и 8 генов *SMN1* и *SMN2* образцов ДНК-пробанда и его родственников.
- II. SSCP- и ПДРФ- анализ ПЦР продуктов 7 и 8 экзонов генов *SMN1* и *SMN2*.
- III. 1. Выявление гомозигот по делеции экзонов 7 и 8 гена *SMN1*. Если больной не является гомозиготой по данному типу делеции (но имеет делецию гена *SMN1*), то образец его ДНК анализируется на наличие конверсии.
2. а) Выявление гетерозигот по делеции экзонов 7 и 8 гена *SMN1*. Если один из роди-

телей не является гетерозиготой по этой делеции, то проводится генеалогический анализ, и ДНК обследованию подвергаются другие родственники (бабушка, дедушка, братья и т. д.). Если в этой семье нет пробанда с делецией в гомозиготе экзонов 7 и 8 гена *SMN1*, то для таких родственников также проводится анализ конверсий.

б) Подтверждение «носительства» СМА.

IV. Подтверждение диагноза у больных СМА.

В настоящий момент данная схема диагностики применяется не только для верификации диагноза СМА, но и при пренатальной диагностике данной патологии. При необходимости возможна косвенная диагностика — ПЦР-анализ динуклеотидных (CA) повторов ДНК-локусов D5S125, D5S112, D5S127, ПДРФ-анализ с фланкирующими ДНК-зондами MU, 105-153RA, 153-6741 GT [2].

Синдром Мартина–Белл, или синдром ломкой X-хромосомы (СЛХ), является наиболее частым после синдрома Дауна наследственным заболеванием, приводящим к ранней умственной отсталости. Данная патология встречается среди мужчин с частотой 1/4000. До недавнего времени диагностика заболевания основывалась на клиническом исследовании и цитогенетическом анализе локуса q27.3 X-хромосомы, включающего ломкий участок.

В 1991 году был клонирован ген *FMR1* (fragile-site mental retardation-1), содержащий ломкий участок FRAXA. Ген состоит из 17 экзонов и занимает около 38 т. п. н. геномной ДНК. В состав первого экзона *FMR1* гена входит протяженный тринуклеотидный повтор CGG, расположенный в области CpG-островка. Основной причиной развития синдрома ломкой X-хромосомы является экспансия CGG-повтора в гене *FMR1*. В норме этот повтор полиморфен, варьируя от 6 до 54 триплетов. Размер аллелей, не имеющих фенотипического проявления и образующих так называемые премутации, находится в пределах от 52 до 200 повторов. У пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы число повторов варьирует от 200 до 1 300–1 500.

Таким образом, в зависимости от количества CGG-повторов X-хромосома может нести нормальный аллель, аллель с премутацией и аллель с полной мутацией (>200 повторов). Полная мутация, как правило, характеризуется аномальным метилированием промоторной области гена *FMR1*. Практическая задача молекулярного анализа заключается в определении того, какой из трех классов CGG-повторов присутствует в исследуемой X-хромосоме (нормальный, премутантный или мутантный).

Диагностика премутаций и мутаций обычно проводится методом блот-гибридизации по Сау-

зерну. Для гибридизационного анализа используют стандартные протоколы рестрикции, электрофоретического разделения и переноса ДНК на мембрану. Двойная рестрикция геномной ДНК эндонуклеазами *EcoRI* и *EagI* дает возможность анализировать не только увеличение длины полиморфной последовательности, но и статус метилирования *FRAXA* локуса. Размер образующихся при рестрикции фрагментов оптимален для выявления премутаций (в том числе небольших по размеру) и полных мутаций.

Существует также альтернативный метод диагностики СЛХ у больных мужского пола по анализу состояния метилирования промоторной области гена *FMR1*, основанный на методе метил-специфической ПЦР.

ПД у носительниц мутантного гена *FMR1* может осуществляться на любом сроке беременности с использованием как прямого, так и косвенного методов (анализа сцепления по микросателлитным маркерам *DXS548*, *FRAXAC1* и *FRAXAC2*). В случае неинформативности перечисленных маркеров или выявления микросателлитной нестабильности в обследуемой семье анализ ДНК-плода проводится методом блот-гибридизации. В случае мужского пола плода возможно проведение диагностики методом метилчувствительной ПЦР на образцах ДНК и полученных клеток амниотической жидкости, хориона или лимфоцитов периферической крови плода.

Миотоническая дистрофия Гофмана–Баттона (**МД**) наследуется по аутосомно-доминантному типу. Клиническая картина заболевания характеризуется крайней вариабельностью. У больных одновременно наблюдаются симптомы миотонии, миопатии и эндокринно-вегетативных расстройств с исключительным разнообразием клинических проявлений. Всего могут быть выделены три четко очерченные формы заболевания:

1. Мягкая форма МД, манифестирующая в среднем и старшем возрасте и характеризующаяся билатеральной катарактой и отсутствием или очень умеренными нервно-мышечными аномалиями.
2. Классическая форма МД начинается на 2–4-м десятилетии жизни с миотонии и прогрессирующей мышечной слабости. Позже присоединяются кардиомиопатия, атрофия гонад, эндокринные нарушения. Больные имеют характерный внешний вид вследствие особенностей строения костей черепа (*frontal balding*) и птоза. Психологические особенности и та или иная степень умственной отсталости также обычны.
3. Врожденная (конгенитальная) форма МД может проявляться еще *in utero* в виде водянки

плода, а постнатально — генерализованной гипотонией новорожденных, дыхательными нарушениями, затруднением сосания и глотания, высокой смертностью и тяжелой задержкой умственного и физического развития.

В большинстве регионов России распространенность МД не превышает 1 на 10 000 новорожденных. Ген МД картирован в области 19q13.3. Продукт гена относится к семейству серин/треониновых протеинкиназ, родственных цАМФ-зависимым протеинкиназам, и потому его обозначают как ДМ-протеинкиназный ген — *DMPK*. В 3'-нетранслируемой области гена *DMPK* локализованы СТГ-повторы, которые в нормальной популяции отличаются высоким уровнем полиморфизма — количество копий варьирует от 5 до 37. Однако у больных миотонической дистрофией количество триплетов значительно больше и составляет не менее 50 при наиболее мягких формах болезни, от 100 до 1000 у пациентов с классической формой МД, в то время как при врожденных формах заболевания может достигать трех тысяч повторов. При МД отмечается также соматическая тканеспецифическая нестабильность СТГ-повторов. Антиципация при миотонической дистрофии наблюдается практически в каждой семье. Показано, что формы врожденной МД встречаются почти исключительно у детей, рожденных от больных матерей. Основой антиципации при атрофической миотонии является увеличение числа СТГ-триплетов, происходящее в ряду поколений. При этом амплификация СТГ-области встречается в материнском гаметогенезе чаще, чем в отцовском.

При молекулярной диагностике МД с использованием метода полимеразной цепной реакции, как правило, не удается наблюдать продукт амплификации мутантного аллеля, поскольку обычный ПЦР-анализ не позволяет амплифицировать участки СТГ-повторов длиной больше 80–100 единиц. По результатам ПЦР у больных миотонической дистрофией обнаруживается лишь по одному аллелю нормального размера. Проводя семейный анализ, в ряде случаев удается подтвердить или опровергнуть диагноз МД и провести пресимптоматическую диагностику у родственников больных.

Для прямой диагностики МД — выявления экспансии СТГ-повторов — необходимо в большинстве случаев проведение блот-гибридизации геномной ДНК с соответствующими зондами. Для каждого пациента рекомендуется проводить два независимых исследования — гибридизация ДНК-зонда p5B1.4 с геномной ДНК, рестрицированной эндонуклеазой *EcoRI* (позволяет корректно выявить экспансии от 500 до 3000 СТГ-повторов), и гибридизация зонда p5B1.4 с ДНК, обработанной

рестриктазой BamH1 (позволяет выявить незначительные изменения длины фрагментов) [6].

Хорея Гентингтона (ХГ) — прогрессирующее аутосомно-доминантное нервно-мышечное заболевание, характеризующееся развитием хореического гиперкинеза и деменции. Симптомы заболевания обусловлены атрофией putamen и хвостатого ядра в головном мозге больных, связанной с преждевременной избирательной гибелью нейронов. В большинстве российских популяций распространенность ХГ составляет 1 на 10 000. Отмечаются значительные различия в отношении возраста начала и тяжести течения заболевания. Более того, даже внутри отдельных семей наблюдается четко выраженная клиническая гетерогенность. При наследовании ХГ по отцовской линии иногда проявляется эффект антиципации — нарастание тяжести течения и уменьшение возраста начала заболевания в ряду поколений.

Ген *IT15*, динамические мутации в котором приводят к развитию ХГ, экспрессируется во многих типах клеток и кодирует белок с молекулярной массой 348 кД, названный гентингтином. В кодирующей области *IT15* на расстоянии 18 кодонов ниже по течению от начала трансляции локализован полиморфный тринуклеотидный повтор (CAG)_n. Число CAG-повторов в гене *IT15* в норме варьирует от 9 до 37, тогда как мутантные аллели пациентов с ХГ несут от 36 до 121 триплета. Обнаружена обратная корреляция длины CAG-повтора с возрастом начала болезни и прямая — со скоростью прогрессирования клинических симптомов. Изменение длины повтора при передаче потомкам объясняет большинство случаев антиципации.

Для мутантных аллелей в диапазоне 36–40 триплетов характерна неполная пенетрантность [15]. Описано значительное количество больных ХГ с подобным числом повторов на мутантном аллеле, и в то же время в этих же родословных могут встречаться клинически здоровые индивидуумы старше 70 лет. Аллели с числом CAG-повторов ≥ 40 всегда связаны с развитием заболевания. Исследование состояния CAG-повторов методом ПЦР в семьях высокого риска позволяет проводить прямую молекулярную диагностику заболевания на любых стадиях онтогенеза, в том числе в досимптоматический период. Вместе с тем важно отметить, что генетическое консультирование в семьях с ХГ (как и в случае других заболеваний с поздней манифестацией) сопряжено со сложностями этического характера. Учитывая доминантный тип наследования, риск получения мутантного гена для детей и сибсов больного ХГ составляет 50 %. Естественно, что исключение носительства, безусловно, должно иметь положительное влияние

на психическое состояние лиц из группы риска. С другой стороны, учитывая отсутствие до настоящего времени эффективных методов лечения ХГ, выявление у пациента аллеля с экспансией практически равнозначно приговору. В настоящее время принято проводить пресимптоматическое обследование только совершеннолетних лиц из группы риска при их непосредственном обращении за консультацией. Серьезным доводом в пользу досимптоматического обследования родственников больных является возможность профилактики заболевания в семьях высокого риска путем проведения пренатальной диагностики.

Пренатальная диагностика моногенных болезней в НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН

Методические подходы к ПД социально значимых моногенных наследственных болезней в НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН начали разрабатываться с момента организации лаборатории в 1987 году. Эти исследования стали особенно интенсивными после 1989 года, когда на базе лаборатории пренатальной диагностики врожденных и наследственных заболеваний человека НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН был организован Федеральный центр молекулярной диагностики наследственных заболеваний. За это время охарактеризованы спектры мутаций, ответственных за развитие таких заболеваний, как муковисцидоз, миодистрофия Дюшенна, гемофилия А и В, фенилкетонурия, спинально-мышечная атрофия, миотоническая дистрофия, ХГ, врожденная гиперплазия коры надпочечников, синдром Мартина–Белла и некоторых других заболеваний.

Впервые в России ПД с использованием ДНК-методов осуществлена в Санкт-Петербурге в 1987 году в лаборатории пренатальной диагностики наследственных и врожденных заболеваний НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН у женщины высокого риска рождения ребенка с муковисцидозом. К концу 2006 года в лаборатории с использованием молекулярных методов обследовано около 6 000 семей (более 20 500 человек) высокого риска различных моногенных заболеваний, в том числе с муковисцидозом, фенилкетонурией, гемофилиями А и В, миодистрофией Дюшенна, синдромом ломкой X-хромосомы [3].

С использованием разработанных в лаборатории алгоритмов проведена ПД в 803 семьях высокого риска моногенной патологии и предотвращено рождение более 250 больных детей, но, главное, около 500 семей получили возможность рождения здорового ребенка.

На сегодняшний день молекулярная диагностика моногенных заболеваний, в том числе и пренатальная, проводится в достаточно ограниченном числе научно-исследовательских центров. К ним относятся НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН, Санкт-Петербург; ИЭМ — Институт экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург; Педиатрическая медицинская академия, Санкт-Петербург; Медико-генетический научный центр РАМН, Москва; Гематологический научный центр МЗ РФ, Москва; Томский институт медицинской генетики; НИИ неврологии РАМН, Томск; Государственный Новосибирский областной клинический диагностический центр; Уфимский научный центр. Спектры заболеваний, диагностируемых в вышеперечисленных центрах, частично перекрываются, однако существуют патологии, которые диагностируются только в определенном центре, причем благодаря развитию современной молекулярной биологии списки заболеваний постоянно расширяются.

Литература

1. Бочков Н. П. Генетические технологии в педиатрии / Бочков Н. П. // Педиатрия. — 1995. — № 4. — С. 21–26.
2. Глотов А. С. Анализ делеционных повреждений в генах SMN1, SMN2 и NAIP у пациентов со спинальной мышечной атрофией Северо-западного региона России / Глотов А. С., Киселев А. В., Иващенко Т. Э., Баранов В. С. // Генетика. — 2001. — Т. 37, № 8. — С. 1156 — 1159.
3. Горбунова В. Н. Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний / Горбунова В. Н., Баранов В. С. — СПб.: Специальная литература, 1997. — 286 с.
4. Иващенко Т. Э. Биохимические и молекулярно-генетические аспекты патогенеза муковисцидоза / Иващенко Т. Э., Баранов В. С. — СПб.: Интермедика, 2002. — 252 с.
5. Иващенко Т. Э. Методы молекулярной диагностики генных болезней // Иващенко Т. Э., Асеев М. В., Баранов В. С. // Медицинские лабораторные технологии: справочник — СПб.: Интермедика, 1999. — Т. 2. — С. 603–617.
6. Изучение аллельного полиморфизма и анализ гаплотипов гена мышечной протеинкиназы у жителей Северо-западного региона России и у больных миотонической дистрофией / Малышева О. В., Иващенко Т. Э., Васильева Т. Н. [и др.] // Генетика — 1998. — Т. 34, № 2. — С. 295–299.
7. Спектр мутационных повреждений гена 21-гидроксилазы у больных с адено-генитальным синдромом / Осиновская Н. С., Иващенко Т. Э., Соболева Е. Л. [и др.] // Генетика. — 2000. — № 8. — С. 1147–1149.
8. Allele polymorphisms, molecular diagnosis & mutations in haemophilia A and B patients from Russia & from some asian republics of former USSR / Aseev M., Surin V., Baboev K. [et al.] // Prenat. Diagn. — 1994. — Vol. 14. — P. 513–522.
9. Comparison of dystrophin gene deletion breakpoint, patterns in Russian and other European Duchenne / Becker muscular dystrophy patients / Evgrafov O. V., Artemyeva O. V., Chuhrova A. L. [et al.] // BJMG. — 1998. — Vol. 1, N 2. — P. 54–59.
10. Dystrophin gene analysis and prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy in Russia / Baranov V. S., Gorbunova V. N., Malysheva O. V. [et al.] // Prenat. Diagn. — 1993. — Vol. 13. — P. 323–333.
11. Identification of Cystic Fibrosis gene: Chromosome walking and jumping / Rommens J. M., Iannuzzi M. C., Kerem B. [et al.] // Science. — 1989. — Vol. 245. — P. 1059–1065.
12. Identification of the cystic fibrosis gene: Cloning and characterization of complementary DNA / Riordan J. M., Rommens J. M., Kerem B. [et al.] // Science. — 1989. — Vol. 245. — P. 1066–1073.
13. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis / Kerem B. S., Rommens J. M., Buchanan J. A. [et al.] // Science. — 1989. — Vol. 245. — P. 1073–1080.
14. Lakich D. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A / Lakich D., Kazazian H. H. Jr., Antonarakis S. E., Gitschier J. // Nat. Genet. — 1993. — Vol. 5, N 3. — P. 236–241.
15. McKusick V. A. Genomics: structural and functional studies of genomes / McKusick V. A. // Genomics. — 1997. — Vol. 45, N 2. — P. 244–249.
16. Morel Y. Clinical and molecular genetics of Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency / Morel Y., Miller W. L. // Adv. Hum. Genet. — 1991. — Vol. 20. — P. 1–68.
17. Reduced penetrance of the Huntington's disease mutation / McNeil S. M., Novelletto A., Srinidhi J. [et al.] // Hum. Mol. Genet. — 1997. — Vol. 6. — P. 775–779.
18. White P. C. Structure of human steroid 21-hydroxylase genes / White P. C., New M. I., Dupont B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1986. — Vol. 83. — P. 5111–5115.

MOLECULAR DIAGNOSTICS OF MONOGENIC DISEASE IN OF OTT'S INSTITUTE OF OBSTETRICS AND GYNECOLOGY OF RAMS

Ivashchenko T. E.

■ **Summary:** In the review the basic approaches used in diagnostics of monogenic disease are considered. Brief characteristic of molecular bases of common diseases is presented. The results of twenty years of study for DNA-diagnostics of monogenic diseases carried out in laboratory for prenatal diagnostics of inherited diseases of Ott's Institute of Obstetrics and Gynecology are summarized.

■ **Key words:** monogenic disease; molecular diagnostics; prenatal diagnostics