

Подходы к ДНК-диагностике моногенных заболеваний в практике медико-генетической консультации Якутии

С.К.Кононова, С.А.Федорова, С.К.Степанова, Э.К.Хуснутдинова

Впервые в практику медико-генетической консультации РБ№1-НЦМ внедрены молекулярно-генетические методы исследования. Разрабатываются подходы к ДНК-диагностике моногенных заболеваний: спиноцеребеллярной атаксии 1-го типа, миотонической дистрофии, болезни Шарко-Мари-Тус, миодистрофии Дюшенна-Беккера, гемофилии А. Обсуждаются состояние и проблемы практического применения ДНК-диагностики в Якутии в рамках дальнейшего развития медико-генетической службы России.

Ключевые слова: ДНК-диагностика, моногенные заболевания, медико-генетическая консультация.

Molecular-genetic research methods have been introduced for the first time into practice of the Medical Genetic Consulting Clinic of the RH№1-NCM. Approaches to DNA-diagnosis of monogenic diseases are being cultivated: spinal cerebral ataxia of type 1, myotonic dystrophy, Sharko-Marie-Tus' diseases, Dushenne-Becker's myodystrophy, A hemophilia. State and problems of the DNA-diagnosis practical application are discussed within further development of the Russian Medical-Genetic Service.

Key words: DNA-diagnosis, monogenic diseases, medical genetic consultation

Моногенные заболевания, составляющие пока еще основу клинической генетики, мир изучает без малого уже сто лет. Годом рождения клинической генетики принято считать 1902 год, когда английский врач А.Гаррод совместно с Ф.Гальтоном и У.Бетсоном опубликовали первое сообщение о рецессивно наследуемом заболевании – алькаптонурии [15].

Однако, несмотря на вековую историю, клиническая генетика – наука молодая и бурно развивающаяся, особенно благодаря успехам молекулярной биологии и генетики, картированию и изучению все большего числа генов, ответственных за то или иное заболевание или признак. В последние годы более пристальное внимание ученых привлекают к себе мультифакториальные заболевания и заболевания с наследственной предрасположенностью, т.к., с одной стороны, болезни, относящиеся к группе моногенных, составляют незначительный процент от общего числа заболеваний, а с другой, – понимание механизмов развития мультифакториальных заболеваний, информация о генетических предрасположенностях конкретного человека к тем или иным заболеваниям и возможность со-

здания индивидуальных подходов к их терапии – все это, безусловно, более интересно и перспективно, чем диагностировать то, что пока невозможно вылечить. Но предиктивная и молекулярная медицина – это дело будущего, на которое работают лаборатории многих стран, а в медико-генетических консультациях врачам приходится сталкиваться с семьями, в которых есть один или несколько больных детей, и, как правило, эти заболевания относятся к моногенным [12].

Моногенные болезни, число которых на сегодняшний день оценивается в 4-5 тысяч нозологий, подчиняются менделевским законам наследования и вызываются повреждением первичной структуры ДНК в одном гене. Несмотря на разнообразие механизмов, вызывающих мутации в генах и приводящих к наследственным заболеваниям, все эти болезни объединяет одно – тяжелое инвалидизирующее течение, в ряде случаев – ранняя смертность, высокий повторный риск в семьях. И хотя, по данным статистики, только 2% семей имеют детей с серьезными наследственными заболеваниями, генетические патологии ответственны примерно за 40% детских смертей. Кроме того, ряд наследственных заболеваний имеет так называемый поздний дебют (Хорея Гентингтона, мозжечковые атаксии и др.), т.е. развиваются на 3-5-десятилетия жизни. Их проявления связаны с высокой инвалидизацией, социальной дезадаптацией и в конечном итоге преждевременной смертью индивидуумов в возрасте наибольшей трудоспособно-

КОНОНОВА Сардана Кононовна, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики отдела молекулярной генетики ЯНЦ РАМН и Правительства РС(Я), к.б.н.; ФЕДОРОВА Сардана Аркадьевна, зав. лабораторией молекулярной генетики отдела молекулярной генетики ЯНЦ РАМН и Правительства РС(Я), к.б.н.; СТЕПАНОВА Светлана Кимовна, врач-биолог МГК РБ №1-НМЦ

сти. Из этих показателей наглядно вытекает огромное социальное значение диагностики наследственной патологии, медико-генетического консультирования семей с целью профилактики возникновения заболеваний, обладающих тяжелым прогрессирующим течением и характеризующихся отсутствием радикальных методов лечения.

Наши исследования проводятся в рамках Республиканской целевой программы «Развитие генодиагностики человека в Республике Саха (Якутия) на 2001-2005 годы», принятой Постановлением Правительства Республики Саха (Якутия) от 11 мая 2001 года №277, предусматривающей расширение объема комплексных профилактических мероприятий по диагностике наследственных заболеваний.

В 2000-2001 гг. в отделе молекулярной генетики МГК впервые внедрены методы молекулярно-генетической диагностики 5 моногенных заболеваний, распространенных в Якутии: спиноцереbellарной атаксии 1 типа (СЦА1), миотонической дистрофии (МД), миодистрофии Дюшенна-Беккера (МДД), болезни Шарко-Мари-Тута типа 1А (ШМТ1А), гемофилии А [14].

Как известно, в молекулярно-генетической диагностике моногенных болезней по возможности используются прямые методы, основанные на поиске патологических мутаций, приводящих к заболеванию. Прямые методы ДНК-диагностики являются точными, могут быть использованы для подтверждения клинического диагноза и в пресимптоматической диагностике. Немаловажно также, что они могут быть информативны в семьях без пробанда, поскольку анализ мутаций возможен у родителей больного ребенка. При разработке подходов к молекулярно-генетической диагностике моногенных заболеваний мы применяли прямую ДНК-диагностику для спиноцереbellарной атаксии 1-го типа, неральной амиотрофии Шарко-Мари-Тута типа 1А и миодистрофии Дюшенна-Беккера. Прямая ДНК-диагностика СЦА1 представлена на рис. 1.

К косвенным (непрямым) методам ДНК-диагностики прибегают либо как к дополнительным, либо в случае невозможности обнаружить мутации в исследуемой семье. Они основаны на анализе тесно сцепленных с патологическим геном полиморфных маркеров. На рис. 2 А,Б показана электрофореграмма двух полиморфных маркеров: ПДРФ HindIII и (СА)_n-повторов

Анализ наследования аллелей этих полиморфных маркеров и заболевания в семье позволяет оп-

ределить, с какими аллелями в данной родословной сцеплен поврежденный ген, и, следовательно, проследить его наследование в данной семье по сцепленным с ним маркерным аллелям. Определяющими условиями для проведения косвенной ДНК-диагностики являются уверенность в клиническом диагнозе, отсутствие генетической гетерогенности, доступность необходимых членов семьи, и, как правило, для исследования требуется генетический материал пробанда [4, 5, 7]. На рис.3 представлен пример обследования семьи с гемофилией А по двум полиморфным маркерам. Как оказалось, одна из сестер пробанда является гетерозиготной носительницей гемофилии А, а другая – не носительница заболевания.

Существуют определенные сложности на организационном и методическом уровнях применения ДНК-диагностики в практике МГК РБ№1-НЦМ РС(Я) (табл. 1). Вероятно, на следующем этапе нам следует продолжить исследования по данным пяти моногенным заболеваниям и улучшить качество проводимых ДНК-анализов, прежде чем широко использовать в практике МГК молекулярно-генетическую диагностику других распространенных в Якутии наследственных болезней.

Одной из проблем использования молекулярно-генетической диагностики при медико-генетическом консультировании является неверно выставленный клинический диагноз или отсутствие точной клинической верификации диагноза. При назначении молекулярно-генетической диагностики врачу-генетику необходимо четко сформулировать задачу исследования, исходя из понимания реальных возможностей используемых методов и технологий, а также предоставить всю необходимую для проведения исследования клиническую информацию, предварительно собранную и проверенную им. Именно такой подход позволяет достичь максимально возможной достоверности и эффективности молекулярно-генетического обследования отягощенных семей и обеспечивает в дальнейшем адекватность интерпретации врачом результатов исследования пациенту [8, 9].

Важным направлением деятельности медико-генетической службы является пренатальная диагностика. При отсутствии радикальных способов лечения моногенных болезней пренатальная ДНК-диагностика является наиболее эффективным способом профилактики наследственных заболеваний. За три года в МГК РБ№1-НЦМ мы осуществили 16 процедур пренатальной диагностики, проведенных

Таблица 1

Состояние разработки подходов к ДНК-диагностике моногенных заболеваний в МГК РБ№1 – НЦМ РС(Я)

Моногенное заболевание	Популяционно-генетические исследования в Якутии	Практическое применение в МГК РС(Я)	Существующие проблемы и недостатки
СЦА1	Изучена генетическая структура и распространенность мутации в популяции [11]	Разработка схемы ДНК-тестирования и медико-генетического консультирования, подтверждение диагноза методом прямой ДНК-диагностики, дифференциальная ДНК-диагностика, пресимптоматическая ДНК-диагностика, пренатальная ДНК-диагностика	Неразработанность медико-социальных аспектов профилактики СЦА1, биоэтические проблемы МГК, связанные с ДНК-тестированием СЦА1
МД	Проведено исследование спектра нормальных вариантов числа СТG-повторов в гене МД в популяции [13]	Определение гетерозиготности по участку СТG-повторов для исключения МД у родственников больных и при дифференциальной диагностике	Методические проблемы применения блот-гибридизации с радиоактивной меткой в рутинных исследованиях
ШМТ1А	Не проводились	Подтверждение клинического диагноза ШМТ1А при выявлении дупликаций в гене RMP22, исключение ШМТ1А при дифференциальной диагностике	Низкий процент выявляемости ШМТ1А, не проводится генотипирование других форм моторной и сенсорной нейропатий ШМТ
МДД/Б	Не проводились	Применение прямой ДНК-диагностики для обнаружения делений экзонов в гене дистрофина с помощью мультиплексной ПЦР, использование аллельных вариантов динуклеотидных СА-повторов в интронах 45,49,50 – STR-45, STR-49, STR-50	Не разработана четкая схема косвенной ДНК-диагностики для семей с МДД/Б с применением различных полиморфных маркеров. Не используются внутригенные полиморфные маркеры
Гемофилия А	Не проводились	Оценка информативности по полиморфным динуклеотидным СА-повторам экзона 13 и ПДРФ HindIII для женщин из семей с гемофилией А	Не разработана четкая схема косвенной ДНК-диагностики для семей с гемофилией А. Не применяется прямая ДНК-диагностика протяженных инверсий в гене F8.

с помощью метода инвазивной хорионбиопсии на ранних сроках беременности. Следует подчеркнуть, что во всех случаях пренатальной диагностики при консультировании беременной приоритетным для врача-генетика был выбор женщины относительно необходимости сохранения или прерывания беременности по медицинским показаниям.

Вместе с тем, как отмечает один из ведущих специалистов в области молекулярной генетики Баранов В.С., «нельзя не отметить наметившийся и быстро увеличивающийся разрыв между научными разработками передовых центров и лабораторной и практической службой медицинской генетики в области молекулярной диагностики».

Благодаря своей универсальности, методы ДНК-диагностики могут быть использованы для диагностики самых разных наследственных заболеваний, список которых по мере увеличения числа картированных и клонированных генов стремительно возрастает [1].

Всего в каталоге наследственных заболеваний Мак-Кьюсика (один из адресов электронной версии каталога в Интернете – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>), включающем описания наследственных болезней, заболеваний с наследственной предрасположенностью и записи о генах, мутации в которых приводят к таким болезням, более 10 300 записей. В настоящее время трудно даже оценить, для какого количества наследственных болезней может быть проведена или уже проводится ДНК-диагностика. По-видимому, таких заболеваний более 1000. Рутинная ДНК-диагностика 385 заболеваний проводится в 280 лабораториях Западной Европы (адрес европейского каталога лабораторий ДНК-диагностики в Интернете – <http://www.eddnl.com>). Это не означает, что каждая лаборатория занимается диагностикой большого количества наследственных болезней – их число редко превосходит 10-12. Обычно лишь ДНК-анализ части этих заболеваний ориентирован на регион, в котором расположена лаборатория, остальные, более редкие заболевания, диагностируются на молекулярно-генетическом уровне для населения всей страны. Кроме того, расширяются связи между лабораториями на международном уровне, особенно в странах Европейского союза. В настоящее время можно с уверенностью сказать, что ДНК-диагностика вышла за стены научных учреждений и во многих странах становится рутинной процедурой, стандартным анализом, показанным для семей со многими наследственными заболеваниями [6, 10].

В России доступны молекулярной диагностике около 50 наследственных заболеваний. Наибольшее количество моногенных болезней диагностируются в лаборатории пренатальной диагностики НИИАиГ им. Д.О. Отта РАМН (более 20 заболеваний) и в лаборатории ДНК-диагностики МГНЦ РАМН (28 моногенных заболеваний). Например, по данным НИИАиГ им. Д.О.Отта, к концу 2000 г. было проведено 594 анализа по пренатальной диагностике моногенных болезней. В 177 случаях диагноз заболевания был установлен и беременности рекомендовалось прервать. Существенно, что остальные обследованные женщины семей высокого риска в результате проведенной диагно-

стики получили реальный шанс с уверенностью родить здорового ребенка [10].

При этом плохая осведомленность не только населения, но даже врачей, включая работников медико-генетической службы, о реальных возможностях пренатальной диагностики наследственных болезней в нашей стране зачастую ведет к досадным недоразумениям, когда семьи высокого риска, обратившись за помощью в зарубежные центры, получают рекомендацию провести необходимые исследования в России, где запрашиваемая диагностика не только вполне осуществима, но и проводится бесплатно [1].

Координацию организационно-методической работы по этой проблеме возложено осуществлять Консультативно-методическому совету медико-генетической службы Минздрава РФ. Специалисты подчеркивают, что необходимо также учитывать и региональные особенности медико-генетической службы, исторически сложившиеся структуры научных и высших учебных заведений, наличие подготовленных кадров. Стимулом для более широкого внедрения молекулярных методов в медицинскую практику могут служить разработки федеральных центров по проблемам ранней диагностики наследственных болезней с использованием ДНК-технологий, однако недофинансирование научных исследований, невозможность оснащения лабораторий современными приборами угрожает уже самому существованию высококвалифицированных лабораторий, обеспечивающих всю систему ДНК-диагностики в России. Необходимо более широкое распространение информации о возможностях отечественных центров в диагностике наследственных заболеваний как среди врачей различных специальностей, так и среди населения, а также формирование регистров наследственных болезней с использованием компьютерных технологий [1, 2, 3].

Согласно приказу N316 Минздрава РФ от 30 декабря 1993 г., в Российской Федерации ДНК-диагностика осуществляется только на федеральном уровне, на базе ведущих научно-исследовательских институтов, выполняющих функции федеральных центров, расположенных в трех городах – Москве, С.-Петербурге и Томске. На сегодняшний день это три лаборатории – лаборатория пренатальной диагностики Института акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта в Санкт-Петербурге, лаборатория ДНК-диагностики Медико-генетического научного центра в Москве и лаборатория молеку-

лярной генетики Института медицинской генетики в Томске. Существуют и другие лаборатории, выполняющие подобные исследования, например, в Гематологическом научном центре (Москва), Уфимском научном центре, в Новосибирске. Однако по ряду причин они пока не могут быть включены в состав структуры медико-генетической службы в ранге лабораторий, осуществляющих рутинную ДНК-диагностику [8, 9, 10].

Объективно России необходимо большее количество лабораторий ДНК-диагностики, однако их создание, по мнению Новикова П.В., не может быть вырвано из контекста общего развития, если не сказать реконструирования, всей системы медико-генетической службы. Во-первых, лаборатории должны опираться на сеть эффективно работающих диагностических медицинских учреждений, обеспечивающих обращение для ДНК-диагностики по крайней мере 300 семей в год. Во-вторых, в обстановке отсутствия достаточного юридического и правового обеспечения данной службы, стандартных протоколов ДНК-диагностики, стандартов обучения и возможностей длительных стажировок и, главное, взаимодействия между лабораторией ДНК-диагностики и другими медико-генетическими службами, создание и становление новой лаборатории занимает несколько лет. Тем не менее существующая централизованная организация ДНК-диагностики неизбежно затрудняет раннюю диагностику не только постнатально (у больных), но и на пренатальном (дородовом) уровне [10]. Таким образом, разработка подходов к ДНК-диагностике моногенных и мультифакториальных заболеваний является особенно актуальной в Республике Саха (Якутия), географически отдаленной от центральных областей России.

Внедрение новейших достижений в области ДНК-диагностики наследственной патологии не только решает текущие вопросы диагностики наследственных болезней, но и поднимает ряд новых проблем – медицинских, этических, юридических, социальных и др. Решать их необходимо при тесном взаимодействии специалистов различных профилей, опираясь на уже достигнутый опыт передовых стран мира.

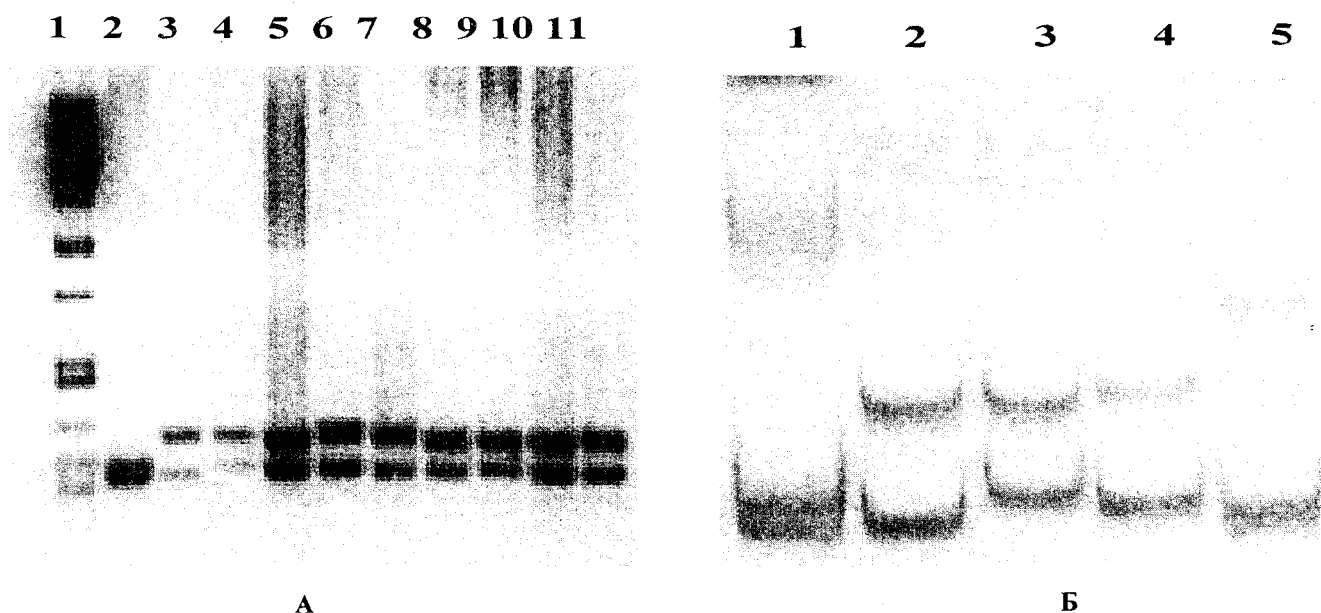


Рис. 1. Электрофореграмма прямой ДНК-диагностики спиноцереbellарной атаксии 1 типа:

А. Электрофорез в 2%-ом агарозном геле:

- 1 – ДНК бактериофага λ , обработанная рестриктазой PstI (ДНК-маркер),
- 2 – здоровый индивид,
- 3, 4 – пациенты с известным числом CAG-повторов 28 и 51 и 32 и 51 соответственно,
- 5-11 – пациенты с удлинённым аллелем гена СЦА1.

Б. Электрофорез в 7%-ом полиакриламидном геле:

- 1 – здоровый индивид с числом CAG-повторов 28 и 30,
- 2 – пациент с известным числом CAG-повторов 28 и 40 (контроль),
- 3-5 – тестируемые пациенты с удлинённым аллелем гена СЦА1



-/- -/- +/- +/+ +/-

А



24 20/24 20/21 20/21 19/21 19 20/21 20/23

Б

Рис. 2. Косвенная ДНК-диагностика гемофилии А

А. Электрофореграмма HindIII полиморфизма 19 интрона гена гемофилии А

“ - ” отсутствие сайта рестрикции;

“ + ” наличие сайта рестрикции.

Б. Электрофореграмма полиморфизма СА-повторов в 13 интроне гена гемофилии А (цифрами указано количество (СА)_n-повторов)

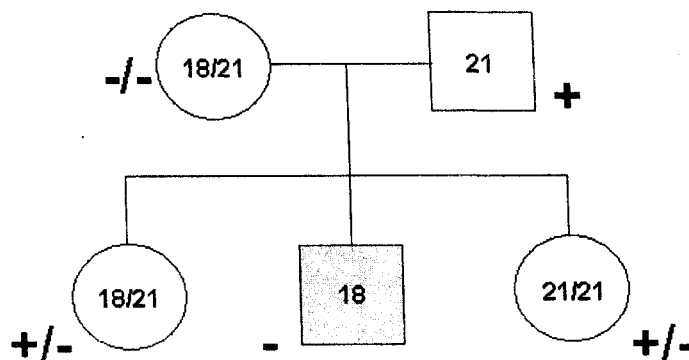


Рис. 3. Фрагмент родословной семьи, отягощенной по гемофилии А (+/-Hind III, 18/21 (СА)_n-повторы)

Литература

1. Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Э. Научные основы предиктивной медицины // Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике / Под ред. А.Б. Масленникова. Вып. 4. – Новосибирск, 2003. – С. 3-19.
2. Бочков Н.П. Этические проблемы современной генетики // Биомедицинская этика. – Вып.3 / Под ред. В.И. Покровского, Ю.М. Лопухина. – М.: Медицина, 2002. – С. 64-70.
3. Венедиктов В.В., Чекнев Б.М. Реформы здравоохранения и проблемы биомедицинской этики // Биоме-

дицинская этика. Выпуск 2 / Под ред. Покровского В.И., Лопухина Ю.М. – М.: Медицина, 1999. – С. 113-127.

4. Горбунова В.Н., Баранов В.С. Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний. – СПб.: Специальная литература, 1997. – 278 с.

5. Горбунова В.Н., Савельева-Васильева Е.А., Кра-
сильников В.В. Заболевания нервно-мышечной системы. Молекулярная неврология. – СПб.: Интермедика, – 2000. – 320 с.

6. Гузев Г.Г. Актуальные проблемы медико-генети-
ческого консультирования // Основы пренатальной ди-
агностики / Под ред. Юдиной Е.В., Медведева М.В. –
М.: РАВУЗДПГ, Реальное время, 2002. – С. 153-174.

7. Иващенко Т.Э., Баранов В.С. Современные методы ДНК-диагностики // Современные методы диагностики наследственных болезней: Материалы научно-практической конференции. – М., 2001. – С. 76-84.

8. Масленников А.Б. Доступность клинической информации как фактор достоверности молекулярно-генетической диагностики // Мат. Всеросс. научн.-практ. конф. «Современные достижения клинической генетики» // Медицинская генетика. – 2003. – Т. 2. – №10. – С. 428.

9. Матулевич С.А. Работа медико-генетической консультации на современном этапе // Мед. генетика. – 2003. – Т. 2. – С. 428.

10. Новиков П.В., Евграфов О.В. ДНК-диагностика наследственных заболеваний у детей в Российской Федерации: состояние и проблемы // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 1999. – №5. – С. 9-14.

11. Платонов Ф.А., Кононова С.К., Гоголев М.П. Структура и распространенность наследственной моз-

жечковой атаксии в Якутии // Неврологический журнал. – 2003. – Т. 8. – №6. – С. 12-15.

12. Поляков А.В., Тверская С.М. Молекулярно-генетический скрининг мажорных мутаций при частых моногенных болезнях // Современные методы диагностики наследственных болезней: Материалы научно-практической конференции. – М., 2001. – С. 85-93.

13. Сухомясова А.Л., Федорова С.А., Коротов М.Н. и др. Миотоническая дистрофия в РС(Я): популяционные особенности и подходы в ДНК-диагностике // Якутский медицинский журнал. – 2003. – №2. – С. 12-17.

14. Федорова С.А., Кононова С.К., Степанова С.К., Ноговицына А.Н. ДНК-диагностика наследственных болезней в РС(Я) // Мат. Всеросс. науч.-практ. конф. «Современные достижения клинической генетики» // Медицинская генетика. – 2003. – Т. 2. – №10. – С. 428.

15. Garrod A.E. The incidence of alkaptonuria: a study in chemical individuality // "Lancet". – 1902. – Vol.2. – P.1616.

