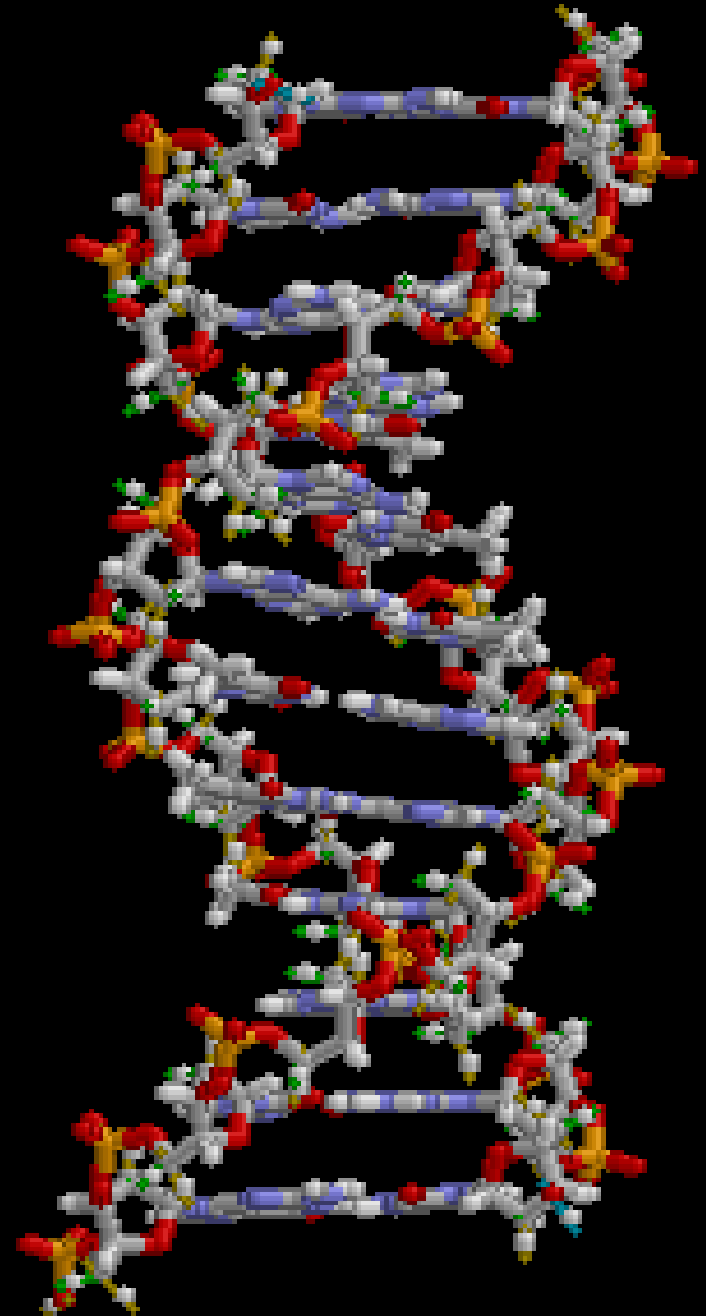




Новые методы генетических технологий в современной науке и практике

д.м.н., доцент Кудрявцева Е.В.
Врач клинический генетик,
акушер-гинеколог



Особенности нашего времени

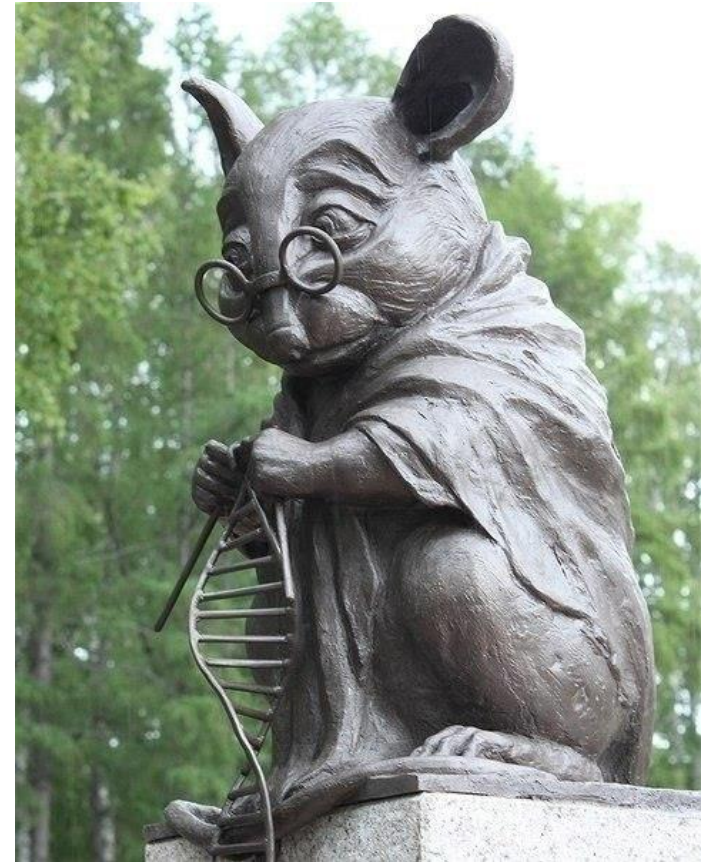
- Развитие пренатальной и предимплантационной диагностики
- Уточнение понятия наследственной предрасположенности
- Возможность полного анализа генома
- Появление молекулярной медицины.
- Генная терапия (совокупность биотехнологических методов, направленных на внесение изменений в генетический аппарат соматических клеток человека с целью лечения заболеваний).

- У человека около **22000** генов
- База Otit – около 6000 моногенных заболеваний и синдромов



Для чего нужна генетическая диагностика

- Установление диагноза
- Определение степени риска повторения заболевания в семье
- Определение прогноза для пациента (продолжительность жизни, прогрессирование заболевания, возможность реабилитации)
- Прогноз эффективности лекарственной терапии или хирургического лечения
- Коррекция терапии



Генетический груз

Генетический груз – вся патология, обусловленная наследственными факторами.

Мутационный – обусловлен мутациями de novo.

Сегрегационный – обусловленный наследуемыми мутациями.

Основа генетического мониторинга – контроль за уровнем генетического груза

Причины роста генетического груза

- изменение экологии
- ухудшение здоровья родителей
- улучшение состояние здоровья больных наследственными заболеваниями
- улучшение диагностики

Задачи практического врача

- В
 - П
 - Н
 - Ц
 - М
- Часто пациенты, с установленной впоследствии хромосомной или моногенной патологией, наблюдались неврологом с одним из следующих диагнозов:
- ДЦП
 - ПП ЦНС
 - Последствия внутриутробной инфекции
 - Родовая травма
 - Симптоматическая эпилепсия
 - ММД и др.

достижений генетики необходимо, чтобы каждый врач был знаком с основными методами генетических исследований

СКИЙ
ИЙ

Проблемы, связанные с генетической диагностикой

- Генетическая гетерогенность заболеваний с общими клиническими симптомами
- Неправильное представление о возможностях тех или иных методов
- Отсутствие алгоритмов применения этих методов в клинической практике
- Ошибки при выборе метода диагностики, лаборатории, трактовке результатов исследования

Какой метод выбрать?

ПЦР

Таргетное
секвенирование

Секвенирование
по Сэнгеру

FISH

MLPA

TMC

NGS

Анализ
кариотипа



Врожденные и наследственные болезни

- Врожденные заболевания могут быть как наследственными, так и приобретенными (например, возникшими под действием тератогенных факторов или осложнений в родах)
- Наследственные заболевания не обязательно являются врожденными или семейными

Отсутствие повторных случаев болезни у членов одной и той же семьи не исключает, что заболевание является наследственным

Классификация наследственных болезней

ХРОМОСОМНЫЕ

- болезни, обусловленные нарушением числа или структуры хромосом

МОНОГЕННЫЕ

- болезни, обусловленные присутствием мутации в одном гене

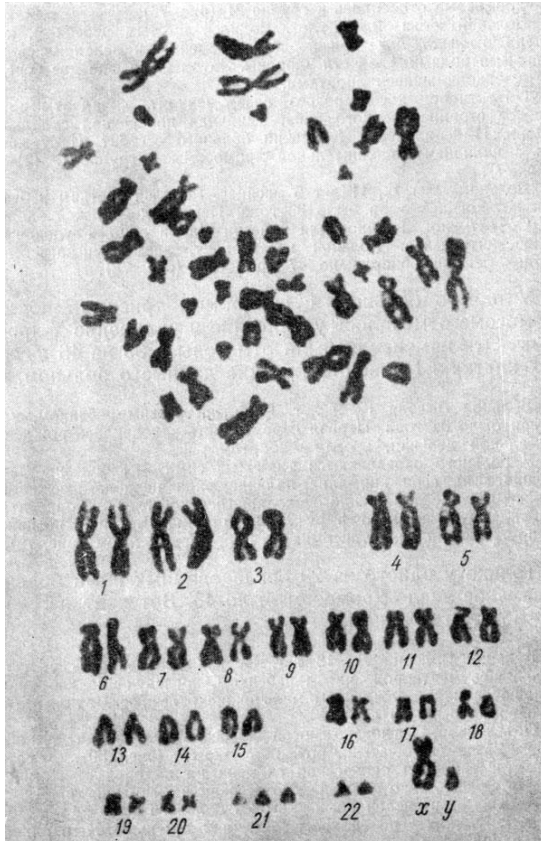
МУЛЬТИФАКТОРИАЛЬНЫЕ

- заболевания, за развитие которых частично отвечает наследственная предрасположенность, а частично – окружающая среда

Профилактика

- первичная – консультирование на предгравидарном этапе
- вторичная (пренатальная диагностика)
- третичная – коррекция нарушений с целью недопущения развития заболевания и его тяжелых последствий (скрининг новорожденных)

Нормальный кариотип

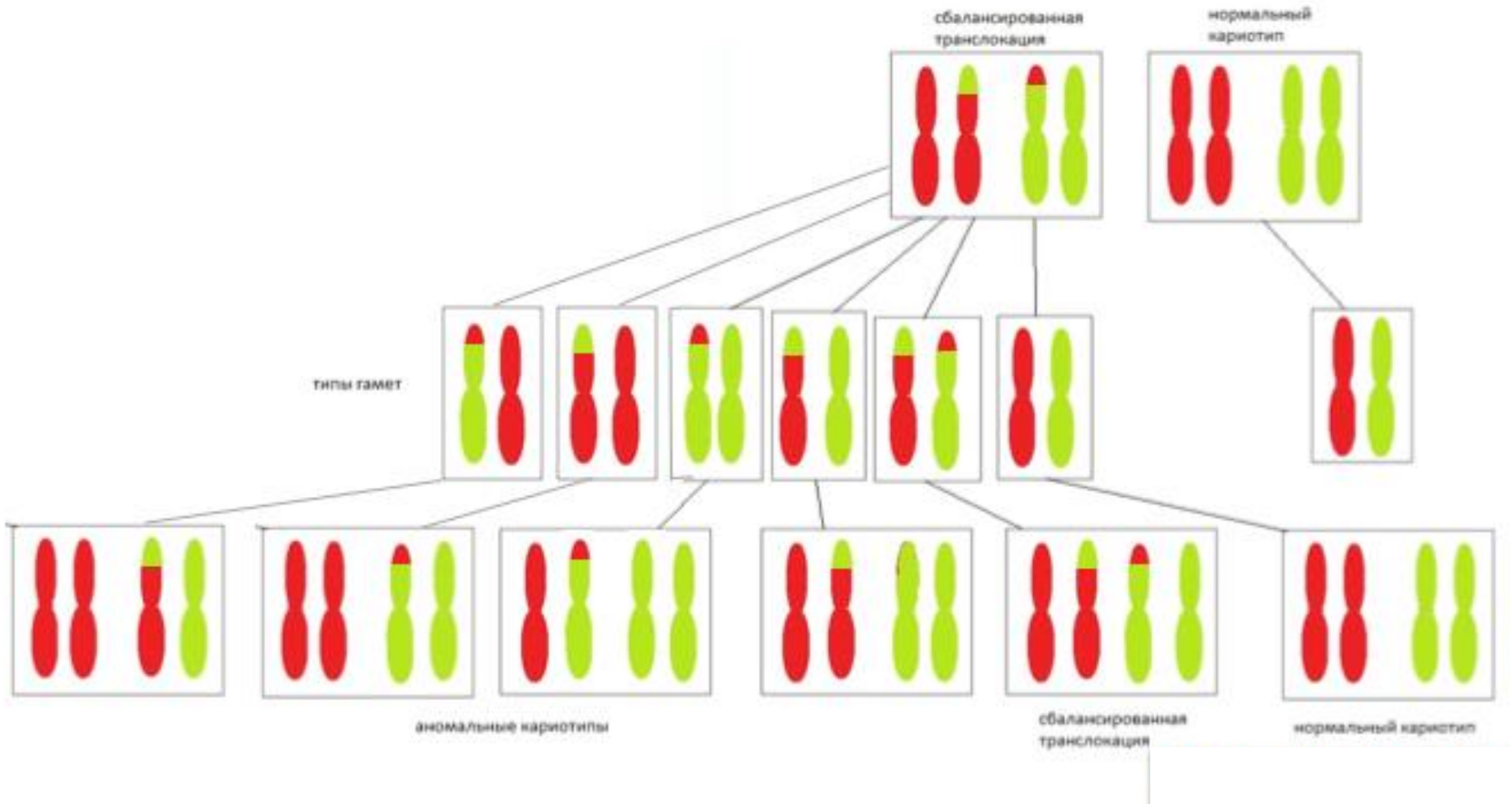


нормальное число хромосом ($2n=46$), нормальный качественный состав (22 пары аутом + 2 половые хромосомы), нормальная структура каждой хромосомы и разнородительское происхождение всех гомологичных хромосом.

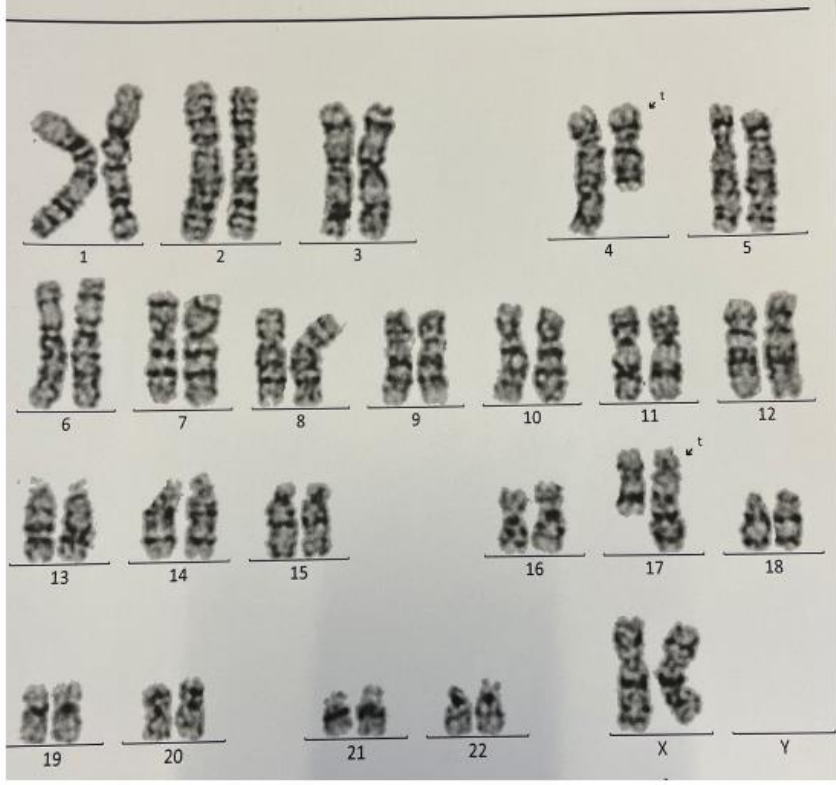
Кариотип не может меняться в течение жизни, поэтому нет необходимости в повторном исследовании

Группа	Частота ХА
Спонтанные выкидыши в 1 триместре	50-70%
Врожденные пороки развития	4-8% (при ВПС – до 13%)
Младенческая и детская смертность	5-7%
Умственная отсталость	3% (IQ<50 – 12-35%)
Мужское бесплодие	2% (при азооспермии – до 15%)
Нарушение половой дифференцировки у мужчин	До 25%
Нарушение пубертатного развития у девочек	Около 27%
Привычное невынашивание беременности	2-5%

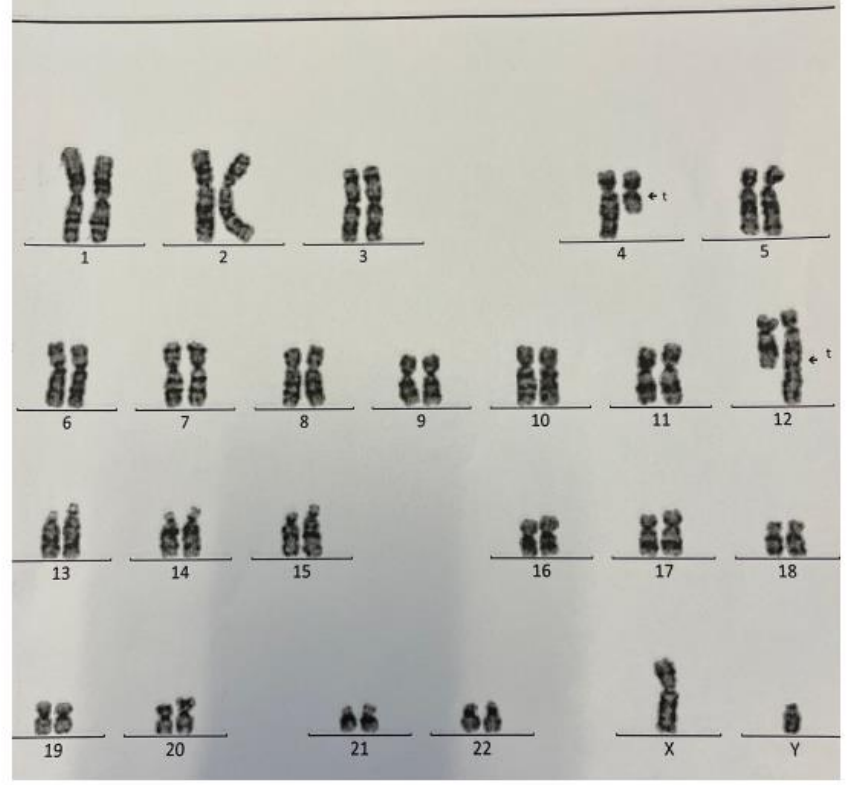
Сбалансированная транслокация – обмен участками ДНК между негомологичными хромосомами (t)



Заключение: Женский кариотип с реципрокной транслокацией между хромосомами 4 и 17



Заключение: Мужской кариотип с реципрокной транслокацией между хромосомами 4 и 12



Аномалии в системе половых хромосом

Мужчины



- Синдром Клайнфельтера (47,XXY)
- Синдром полиигрик (47,XYU)

женщины



- Синдром Тернера (45,X)
- Полисомия X хромосомы (47,XXX)

**Заподозрить
аномалии в
системе
половых
хромосом
можно по
следующим
признакам:**

Девииации роста

**Изменение
телосложения**

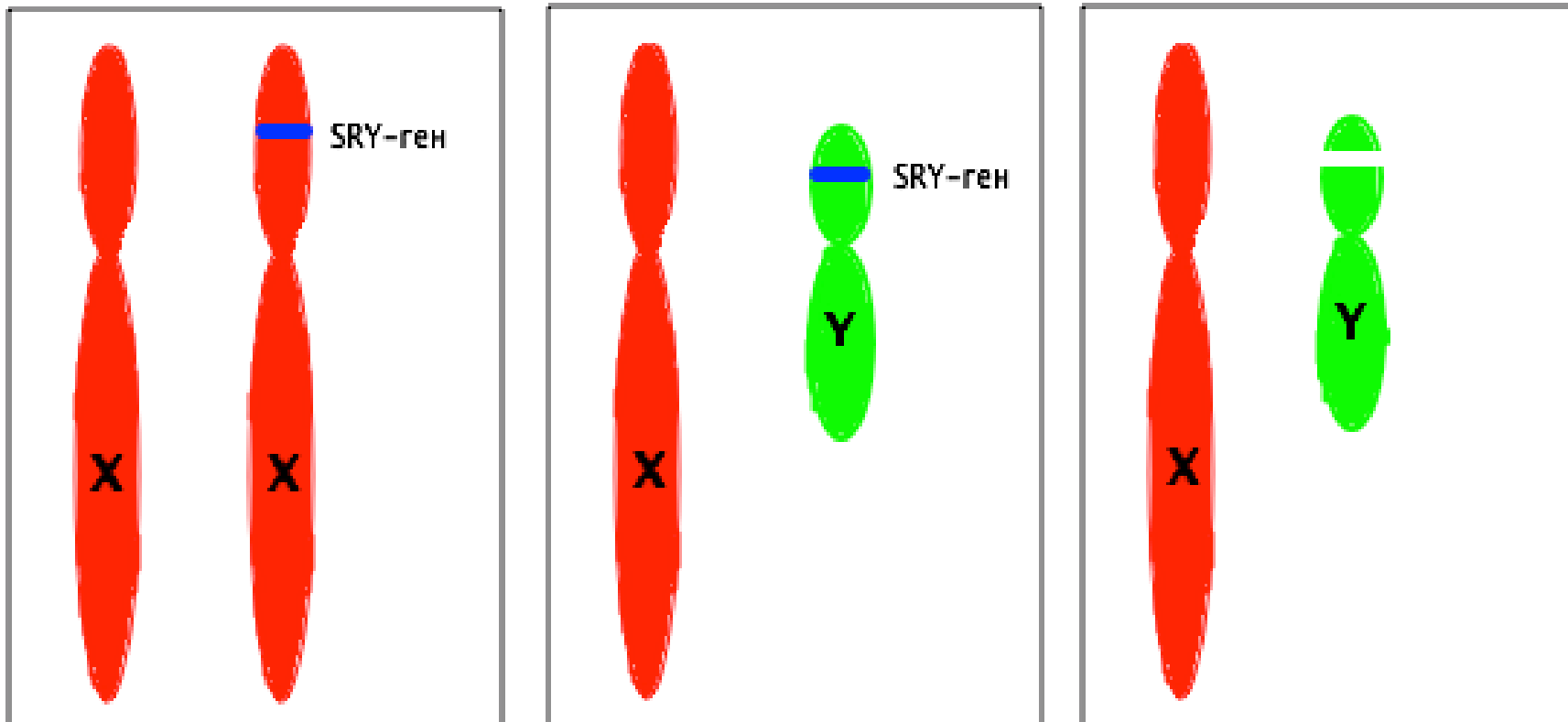
**Задержка полового
развития**

**Аномалии наружных и
внутренних половых
органов**

Бесплодие

**НМЦ у женщин,
азооспермия у мужчин**

Несоответствие генетического и фенотипического пола



Инверсия пола: анализ наличия SRY гена

В задачу врача-генетика входит объяснение последствий носительства перестройки для репродукции. Решение о продолжении попыток забеременеть естественным путем или при использовании ЭКО с ПГТ, или использованием донорских гамет принадлежит семье.

При беременности решение вопроса о проведении инвазивной пренатальной диагностики.

**Частота невынашивания
беременности – 18-20% от числа
наступивших беременностей**

(Сидельникова В.М., 2010)

***Преимплантационные потери –
гибель зигот до реализации
процесса nidации***

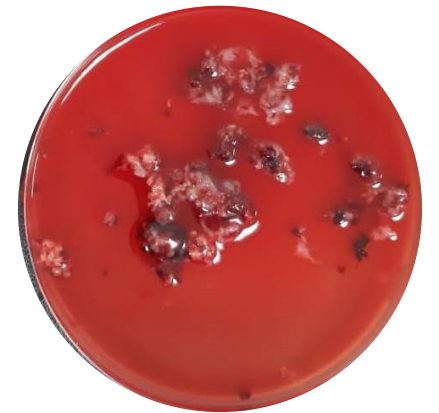
Риск последующей потери беременности

- После 1 случая невынашивания в анамнезе – 18-20%
- После 2х случаев – 30%
- После 3х случаев – 43%



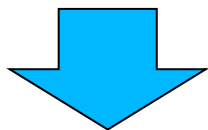
Определение причин невынашивания беременности

- 50-70% случаев невынашивания беременности обусловлены хромосомными аномалиями у эмбриона
- Генетический анализ abortивного материала помогает определить причину невынашивания и оптимизировать алгоритм обследования при подготовке к следующей беременности



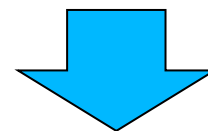
Привычное невынашивание и генетический анализ эмбриона

Повторные случаи
невынашивания,
ассоциированные с
хромосомными
аномалиями у
плода/эмбриона



ЭКО + ПГТ

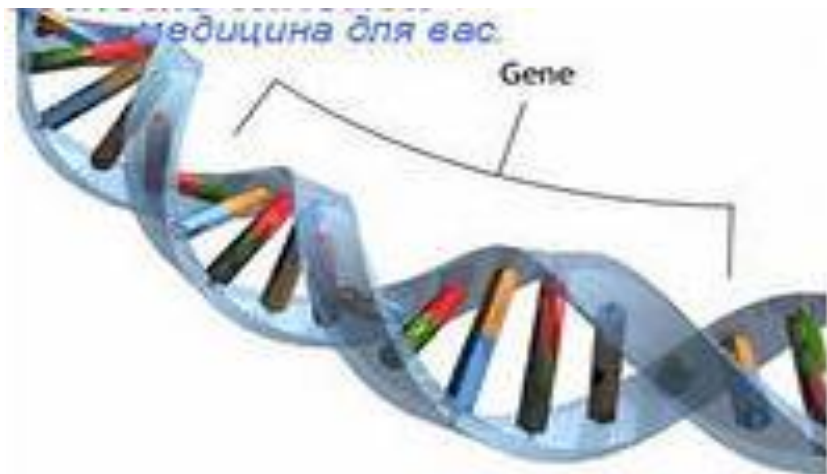
Повторные случаи
невынашивания
беременности при
нормальном кариотипе
плода/эмбриона



**ВРТ не
эффективны!!!**

Моногенные болезни

- Количество составляет около 6000
- Мутации могут передаваться из поколения в поколение (рецессивный тип наследования) или возникать спонтанно в половых клетках родителей (доминантные заболевания)
- Моногенные варианты течения заболеваний могут встречаться среди любых нозологических форм, которые в общем случае не являются наследственными (ДЦП, эпилепсия и др.)



Общие черты генетических заболеваний

- Отличаются более тяжелым течением и ранним дебютом
- Хронический характер и прогрессивность течения с нарастанием негативных симптомов
- Значительное число моногенных заболеваний составляют различные формы умственной отсталости, болезни нервной системы, мышечные дистрофии, заболевания сопровождающиеся эпилептическими приступами и аутоподобным компонентом
- Заболевания, возникающие под влиянием различных мутаций могут иметь сходную клинику
- Диагностика отдельных заболеваний, выявление мажорных мутаций не всегда дают результат

Генетические панели

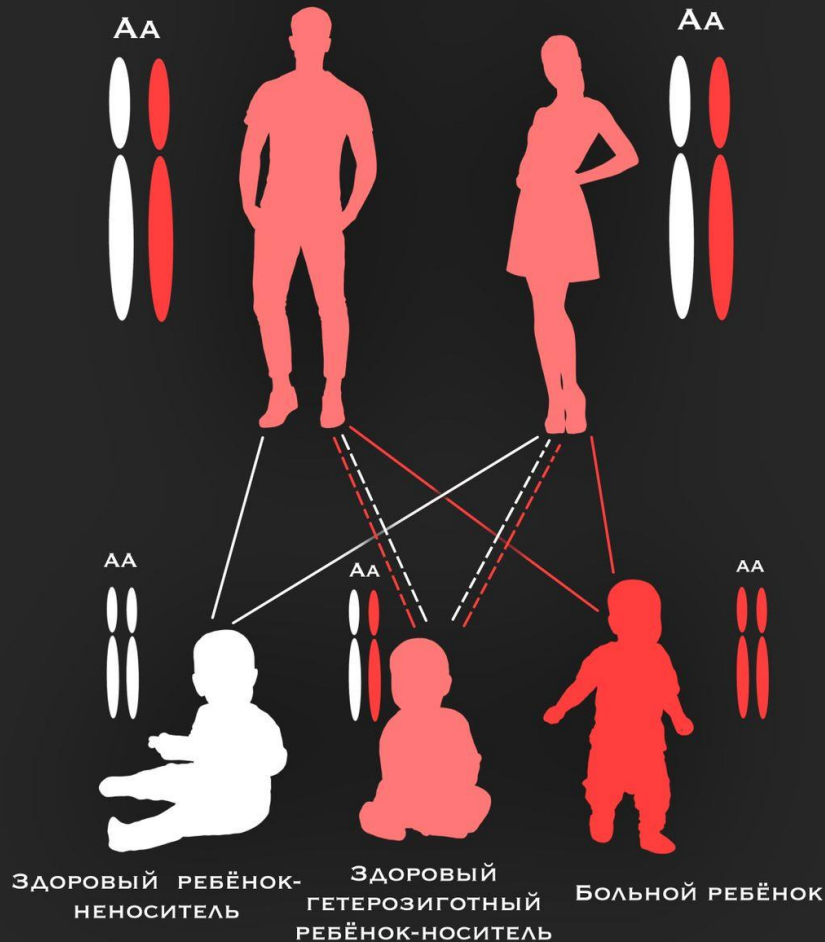
- Нейродегенеративные заболевания
- Умственная отсталость и расстройства аутистического спектра
- Нервно-мышечные заболевания
- Наследственные эпилепсии
- Заболевания соединительной ткани
- Наследственные нарушения обмена веществ
- Наследственная глухота
- Наследственный рак
- Нарушения репродукции

Секвенирование экзома / генома

- Клиническое секвенирование экзома - анализ 5000 генов
- Полное секвенирование экзома - анализ 200000 генов
- Секвенирование генома: интронные участки, структурные перестройки, митохондриальные заболевания
- Наиболее эффективно – «трио» подход

Аутосомно-рецессивный тип наследования

ЗДОРОВЫЕ ГЕТЕРОЗИГОТНЫЕ РОДИТЕЛИ-НОСИТЕЛИ



На сегодняшний день описано более 5000 моногенных заболеваний (состояний), и это число увеличивается практически еженедельно

Риск рождения ребенка с аутосомно-рецессивным имеют в среднем 1-2% пар, в популяциях, где распространены имбридные браки — существенно выше

Анализ носительства наследственных заболеваний (Скрининг на носительство наследственных заболеваний расширенный/экспертный)

- Обеспечивает анализ носительства мутаций широкого спектра (муковисцидоз, фенилкетонурия, спинальная мышечная атрофия, болезнь Тея-Сакса и др.)
- 500/2500 генов

Каждый человек является носителем от 3 до 10 мутаций, которые могут привести к наследственным заболеваниям у его детей



- Скрининг на носительство НБ - способ узнать о высоком риске моногенного заболевания для потомства до рождения ребенка с генетической патологией
- Дети с генетическими заболеваниями могут рождаться в семьях без отягощенной наследственности
- Ни одно генетическое заболевание не изолировано строго в определенных популяциях
- Носителями рецессивных мутаций каких-либо НБ являются все люди
- Предполагается, что генетический скрининг на носительство наследственных заболеваний будет способствовать более рациональному принятию репродуктивных решений

Виды тестирования



Поиск конкретных вариантов в ограниченном списке генов

Расширенный список заболеваний (с частотой носительства более 1:100)

«Экспертный» – до нескольких тысяч генов

Клинический пример

Положение (hg19)	Генотип	Ген	Положение в кДНК	Замена АК	Экзон	Транскрипт	Частота аллеля*	Глубина прочтения
chr13:52518281G>T	G/T	<i>ATP7B</i>	c.3207C>A	p.His1069Gln	14	NM_000053.3	0.090847%	232x
chr15:58855748C>T	C/T	<i>LIPC</i>	c.1214C>T	p.Thr405Met	8	NM_000236.2	0.2759473%	127x
chr17:15907577G>C	G/C	<i>TTC19</i>	c.581+1G>C	-	инт. 6	NM_017775.3	н/д	45x
chr2:26418053C>G	C/G	<i>HADHA</i>	c.1528G>C	p.Glu510Gln	15	NM_000182.4	0.1202537%	94x

Положение (hg19)	Генотип	Ген	Положение в кДНК	Замена АК	Экзон	Транскрипт	Частота аллеля*	Глубина прочтения
chr12:110034320G>A	G/A	<i>MVK</i>	c.1129G>A	p.Val377Ile	11	NM_001114185.2	0.1409876%	113x
chr2:26416570CAG>C	N/del	<i>HADHA</i>	c.1759_1760delCT	p.Leu587fs	17	NM_000182.4	н/д	60x

*Частоты аллелей приведены по базе Exome Aggregation Consortium (выборка до 60702 человек). н/д = нет данных (не описан)

Расширенный скрининг методом NGS



- Несмотря на то, что более 70% НБ встречается крайне редко, их суммарный груз может быть достаточно ощутимым
- Для анализа носительства на “частые” НБ можно выявить не только мажорные патогенные мутации, но и множество вариантов, встречающихся редко



- Дополнительная информация порождает дополнительные вопросы, некоторые из которых могут остаться без ответа
- Может потребоваться дальнейшее тестирование и дополнительные затраты

Предимплантационное генетическое тестирование

ПГТ - выявление генетических нарушений у эмбриона человека перед имплантацией в слизистую оболочку матки, то есть до начала беременности (может быть проведена только в программах ЭКО).

Выполнение предимплантационного генетического скрининга не только снижает риск рождения ребенка с хромосомной патологией, но и повышает эффективность ЭКО, так как значительная часть неудач обусловлена с хромосомными аномалиями у эмбриона

Предимплантационное генетическое тестирование

ПГТ-А –

тестирование на хромосомные анеуплоидии

Показания: возраст женщины старше 35 лет, неудачные попытки ЭКО в анамнезе, тяжелые нарушения сперматогенеза у мужчины

ПГТ-СП –

тестирование на структурные перестройки хромосом

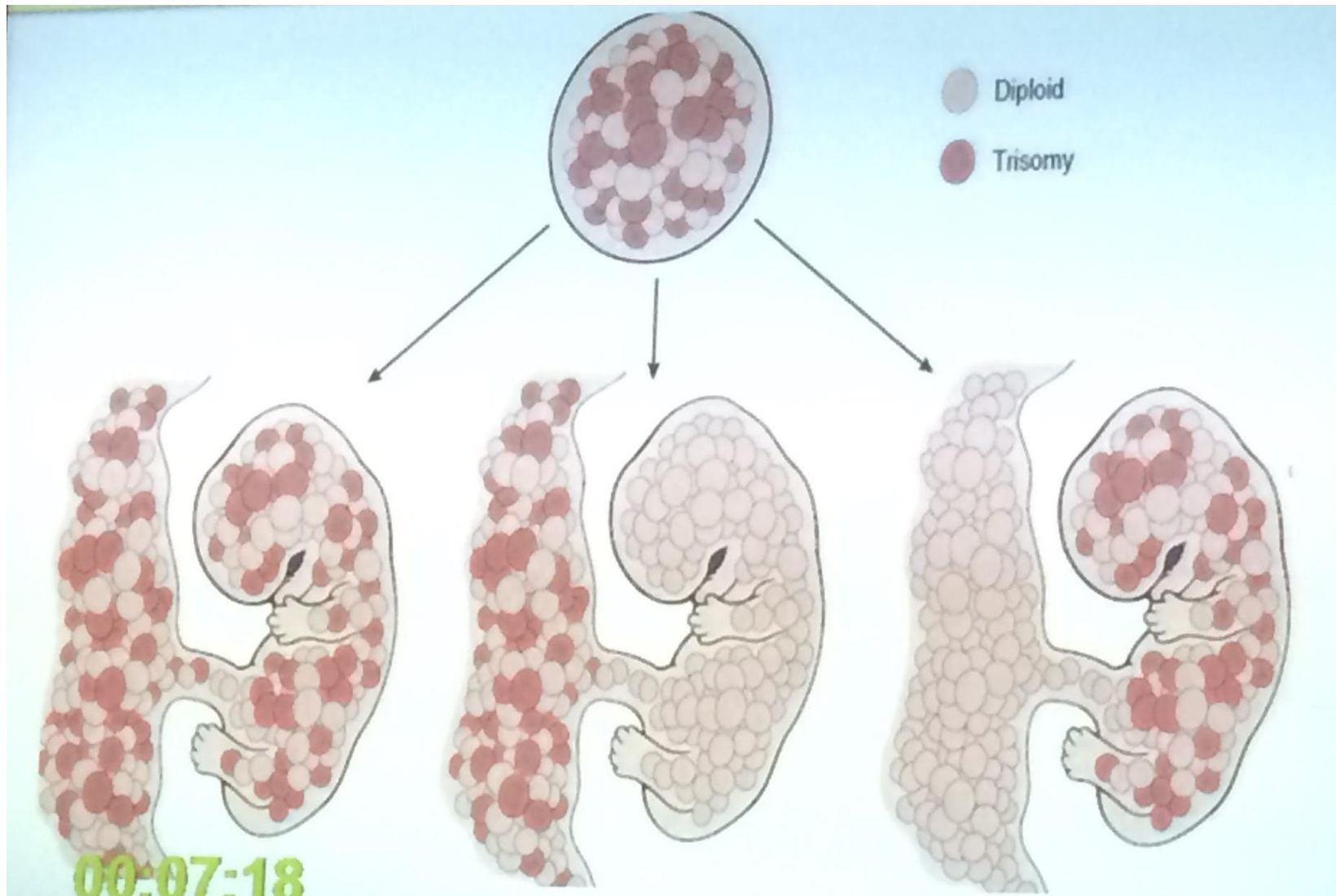
Показания: выявление сбалансированных хромосомных перестроек у супругов

ПГТ-М – тестирование

эмбриона на моногенные заболевания

Показания: определение высокого риска моногенного заболевания для потомства (обязательно должны быть идентифицированы конкретные мутации)

Фетальный и плацентарный мозаицизм



Пренатальная диагностика

Составляющие пренатальной диагностики

- **Медико-генетическое консультирование**
- **УЗИ-скрининг**
- **б/х скрининг**
- **получение плодного материала**
- **лабораторная диагностика
(цитогенетическая, молекулярная)**
- **рекомендации по результатам ПД**

Методы ПД

Непрямые

1. Общеклиническое обследование и анамнез
2. Генеалогический метод
3. Лабораторное и инструментальное обследование
4. Анализ эмбриоспецифических белков

Прямые

Неинвазивные

1. УЗИ
2. КТГ
3. МРТ
4. НИПТ

Инвазивные

1. АВХ
2. Плацентобиопсия
3. Амниоцентез
4. Кордоцентез
5. Фетоскопия
6. Биопсия тканей плода

Неинвазивная пренатальная диагностика основана на получении фетальной ДНК из крови матери

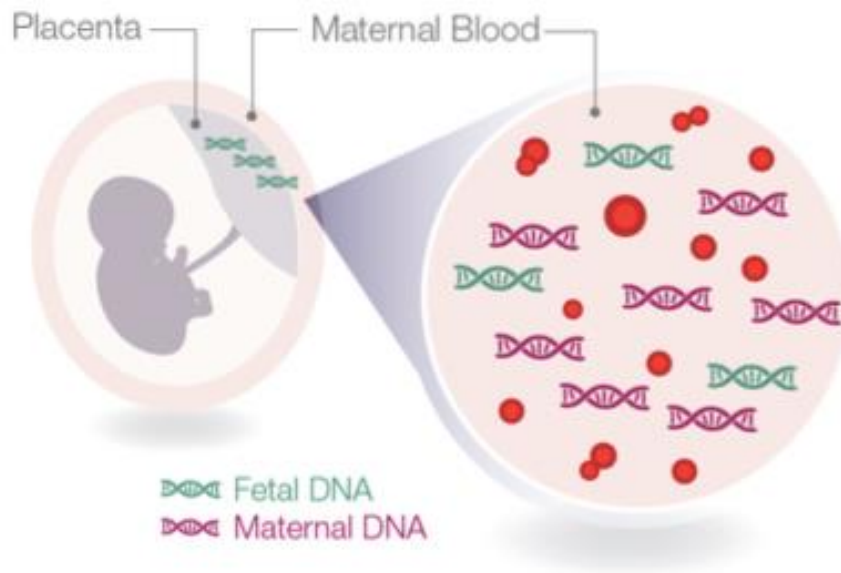
МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

**ПРОВЕДЕНИЕ НЕИНВАЗИВНОГО ПРЕНАТАЛЬНОГО ДНК-СКРИНИНГА
АНЕУПЛОИДИЙ ПЛОДА ПО КРОВИ МАТЕРИ (НИПС)
МЕТОДОМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ**

2024

Фетальная ДНК

- Появляется с 4й недели беременности
- Надежно определяется с 7-8 недели беременности



Неинвазивная пренатальная диагностика основана на получении фетальной ДНК из крови матери

История НИПТ

- Впервые внедрен в клиническую практику в августе 2011 года в Гонконге
- С октября 2011 года появился в США, и далее стал распространяться по странам Европы
- В 2014 году стал доступен в России
- В 2017 году появился российский тест «НИПС»
- С 2026 года включен в программы ОМС

Заключение по результатам неинвазивного пренатального теста

Исследование выполнено в лаборатории NATERA, США (Natera, Inc. 201 Industrial Road Suite 410 San Carlos, CA 94070) методом массового параллельного секвенирования с биоинформационной обработкой по алгоритму NATUS

Пациент: Кудрявцева Елена Владимировна
 Дата рождения: 13.05.1982
 Срок беременности (недель): 9
 Номер набора: 1621344
 Номер исследования: 767583

Дата забора материала: 06.04.2016
 Дата поступления материала в лабораторию: 11.04.2016
 Дата готовности анализа: 15.04.2016

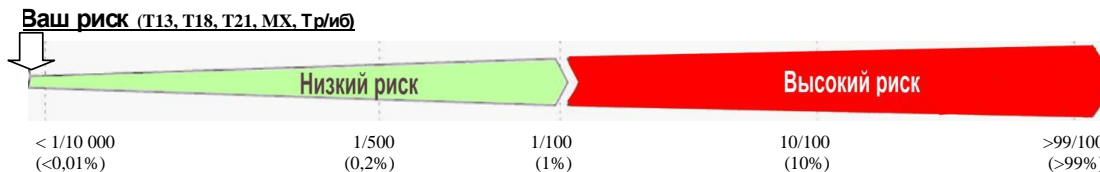
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Фракция фетальной ДНК: 7.3%
 Пол плода: Женский

Риск Низкий

Исследуемая хромосома	Вычисленный риск по результатам лабораторного исследования	Комментарий
Трисомия 21 (Синдром Дауна)	<1/10000 (<0.01%)	Риск низкий
Трисомия 18 (Синдром Эдвардса)	<1/10000 (<0.01%)	Риск низкий
Трисомия 13 (Синдром Патау)	<1/10000 (<0.01%)	Риск низкий
Моносомия X (Синдром Тернера)	<1/10000 (<0.01%)	Риск низкий
Триплоидия/Исчезающий близнец		Риск низкий

Заключение: По результатам исследования ДНК плода, выделенной из крови матери, риск рождения ребенка с трисомией 21, 18, 13 хромосомы, моносомией X хромосомы или триплоидией/синдромом исчезающего близнеца составляет менее 0,01%.



Важная информация: Ни одно из существующих исследований не может гарантировать отсутствия у будущего ребенка любых отклонений. Неинвазивный пренатальный тест является скрининговым методом, основанном на анализе свободноциркулирующей ДНК плода. Неинвазивный пренатальный тест выявляет риск только трисомии 21, 18 и 13 хромосом, числовых аномалий половых хромосом, триплоидии у плода и синдрома исчезающего близнеца. С его помощью нельзя выявить все генетические или негенетические проблемы, которые могут быть у будущего ребенка. Даже если результаты теста отрицательные невозможно полностью исключить все потенциальные проблемы, связанные с 21, 18, 13 и половыми хромосомами, например, микроделеции или микродупликации небольших участков этих хромосом. Методика исследования не позволяет исключить мозаицизм у плода и/или плацентарный мозаицизм по этим хромосомам. Для правильной интерпретации результатов исследования, получите дополнительную консультацию специалиста.

Врач-генетик

Кудрявцева Е.В.



Дополнительное использование неинвазивной ПД:

- положительный резус-фактор плода при отрицательном резусе у матери
- определение пола (важно для семей, имеющих в родословной сцепленные с полом заболевания)
- неинвазивное определение отцовства

Показания для проведения инвазивной пренатальной диагностики

- Высокий риск по результатам скрининга
- Пороки развития плода, выявленные по УЗИ
- Наличие диагностированной тяжелой моногенной патологии в семье
- Аномальный кариотип у кого-либо из супругов

РИСКИ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ИНВАЗИВНЫМИ ПРОЦЕДУРАМИ

Амниоцентез

- Прерывание беременности: **0,11 – 0,56 %**
- Гибель плода: **0,09 %**

Хорионбиопсия

- Прерывание беременности/гибель плода: **0,21 – 0,22 %**

Кордоцентез

- Прерывание беременности/гибель плода: **1-2 %**

Хромосомный микроматричный анализ (молекулярное кариотипирование)

- Используется пренатально и постнатально
- Разрешающая способность в 100-1000 раз выше, чем при кариотипировании
- Может использоваться как пренатально, так и постнатально
- Тест на 400 синдромов (микроделеции, микродупликации)
- Не позволяет диагностировать сбалансированные перестройки, мутации генов
- Не определяет локализации дисбаланса



Трисомии аутосом



Результаты исследования:

Молекулярный кариотип (в соответствии с ISCN 2016): **arr(21)x3**

Пол плода: женский.

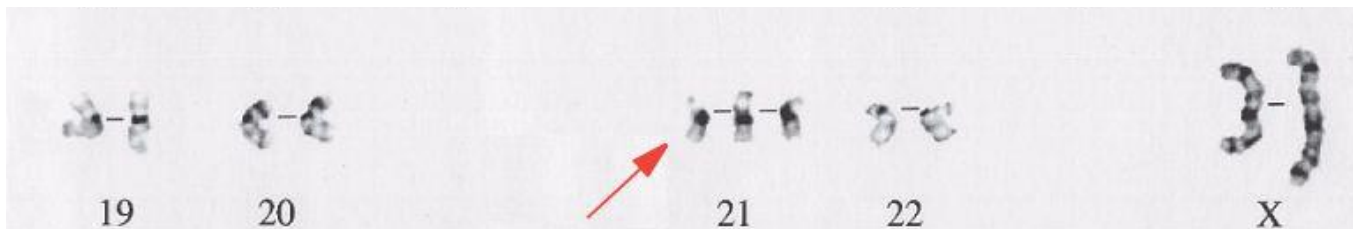
Анеуплоидии одной или нескольких хромосом: **Обнаружена трисомия 21 хромосомы.**

Триплоидия: не обнаружено.

Полногеномная однородительская дисомия: не обнаружено.

Микроделеций и микродупликаций размером более 800 kb: не обнаружено.

Заключение: Обнаружена трисомия 21 хромосомы.



Робертсоновская транслокация (46,XX,rob15;21)



Результаты исследования:

Молекулярный кариотип (в соответствии с ISCN 2016): **arr(21)x3**

Пол плода: женский.

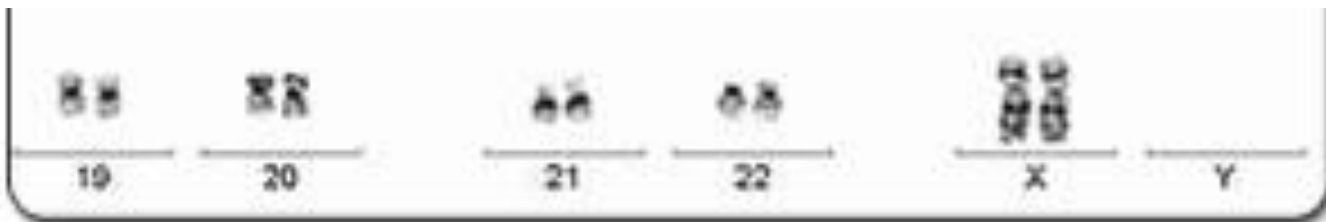
Анеуплоидии одной или нескольких хромосом: **Обнаружена трисомия 21 хромосомы.**

Триплоидия: не обнаружено.

Полногеномная однородительская дисомия: не обнаружено.

Микроделеций и микродупликаций размером более 800 kb: не обнаружено.

Заключение: Обнаружена трисомия 21 хромосомы.



**Третичная
профилактика
(скрининг
новорожденных)**

Скрининг новорожденных

массовое обследование всех родившихся живыми детей с помощью специальных лабораторных тестов для выявления некоторых тяжелых наследственных болезней до появления клинических симптомов

Цель: раннее выявление и раннее лечение заболевания, недопущение инвалидизирующих осложнений заболевания, улучшение качества жизни.

Частота наследственных болезней обмена

- Частая $>1:10000$
- Умеренная $1:10000-1:40000$
- Редкая $<1:40000$

Орфанные заболевания – редкие заболевания, затрагивающие небольшую часть популяции. Для стимуляции их исследований и создания лекарств для них требуется поддержка со стороны государства

Скрининг в России (до 2023):

- Фенилкетонурия 1:8-10000
- ВГКН 1:5-15000
- Муковисцидоз 1:3-5000
- Галактоземия 1:15-20000
- Гипотиреоз 1:3000-1:5000

Расширенный неонатальный скрининг в РФ (с 2023 г.)

- Дефицит биотинидазы
- Дефицит синтеза биоптерина
- Нарушение обмена тирозина
- Лейциноз
- Пропионовая ацидемия
- Метилмалоновая ацидемия
- Изовалериановая ацидемия
- 3-гидрокси-3-метилглутаровая н-ть
- Бета-кетотиолазная н-ть
- Нарушение обмена жирных кислот
- Н-ть мтх трифункционального белка
- Н-ть карнитин пальмитоилтрансферазы
- гомоцистинурия
- Цитруллинемия
- Аргиназная н-ть
- Глутаровая ацидемия
- СМА
- Первичные иммунодефициты

**Этические проблемы
генетических
исследований**

***Этические проблемы обусловлены тем,
что генетическое тестирование
облегчает доступность интимных
биологических особенностей человека.
Существует определенный риск
дискриминации, риск для частной жизни
самого обследуемого и его
родственников***

Особенности генетической информации:

- **Она позволяет с различной степенью вероятности предсказать будущее состояние здоровья человека, здорового на момент обследования, и может быть использована для ущемления его прав и в качестве оснований для дискриминации при использовании третьими сторонами (при вступлении в брак, при приеме на работу, при выплате страховки);**
- **Она может оказывать значительное воздействие на семью на протяжении нескольких поколений, включая потомков обследуемого;**
- **В плане конфиденциальности интересы больного противоречат интересам его семьи**

Этические проблемы тестирования генов предрасположенности

- **тестирование имеет вероятностный характер**
- **возможности диагностики превышают возможности действий**
- **нет четких индивидуальных рекомендаций**
- **никто генетически не совершенен**
- **оценка повторного риска остается групповой эмпирической а не индивидуальной**

Признание врачами важной роли религии в формировании этической составляющей общественного сознания поддерживает интерес к мнению Русской Православной Церкви по различным проблемам биомедицинской этики.



Основы Социальной концепции Русской Православной Церкви



Раздел XII – «Проблемы биоэтики»

Основы Социальной концепции Русской Православной Церкви (2000 г.) о пренатальной диагностике

пренатальная диагностика может быть оправдана только в том случае, если предполагается лечение пациента (ребенка во чреве), а не его убийство. Правом на жизнь, любовь и заботу обладает каждый человек, независимо от наличия у него тех или иных заболеваний.

Основы Социальной концепции Русской Православной Церкви (2000 г.) о генетическом тестировании

Создание “генетического паспорта” при разумном использовании полученных сведений помогло бы своевременно корректировать развитие возможных для конкретного человека заболеваний”.

В то же время содержится предупреждение о том, что: “... имеется реальная опасность злоупотребления генетическими сведениями, при котором они могут послужить различным формам дискриминации. Кроме того, обладание информацией о наследственной предрасположенности к тяжким заболеваниям может стать непосильным душевным грузом. Поэтому, генетическая идентификация и генетическое тестирование могут осуществляться лишь на основе уважения свободы личности”

Спасибо за
внимание!!!

ekud2019@gmail.com

