

Е.И. Нилова, О.В. Нилова, Е.А. Харитоновна
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ
ЗАБОЛЕВАНИЙ

ФГБОУ ВО Тверской государственный медицинский университет Минздрава России

Резюме: В данной статье описаны молекулярно-генетические методы диагностики наследственных болезней. Изучена современная литература по этапам диагностики, их использованию в клинической практике. Рассмотрены клинические примеры наиболее часто встречающихся заболеваний, которые диагностируют с помощью молекулярно-генетических методов.

Ключевые слова: молекулярно-генетические методы, наследственные заболевания, полимеразная цепная реакция, геном, мутации, рестрикция ДНК, амплификация ДНК, электрофорез, гибридизация, секвенирование, желудочковая тахикардия.

MOLECULAR-GENETIC METHODS FOR THE DIAGNOSIS OF HEREDITARY
DISEASES

E. I. Nilova, E. A. Kharitonova, O. V. Nilova
Tver State Medical University

Summary: This article describes molecular-genetic methods for the diagnosis of hereditary diseases. The modern literature on the stages of diagnosis and their use in clinical practice has been studied. Clinical examples of the most common diseases that are diagnosed using molecular-genetic methods are considered.

Key words: molecular-genetic methods, hereditary diseases, polymerase chain reaction, genome, mutations, restriction of DNA, amplification of DNA, electrophoresis, hybridization, sequencing, ventricular tachycardia.

Молекулярно-генетические методы диагностики наследственных болезней стали внедрять в практику с 70-х годов XX в., и до настоящего времени они остаются бурно развивающейся областью науки и медицины. В основе этих методов лежат манипуляции с ДНК и РНК. Молекулярно-генетические методы позволяют выявить нарушения в геноме, вызывающие наследственные болезни [4, 5]. Благодаря им можно прогнозировать проявление заболевания у потомства, назначать лечение и корректировать состояние больных. В настоящее время данная область науки находится в постоянном развитии и совершенствовании, позволяет выявлять и лечить болезни, ранее считавшиеся неизлечимыми.

Проведён анализ данных литературы и публикаций в интернет-источниках об этапах получения последовательностей нуклеотидов ДНК, наиболее часто встречающихся методах идентификации фрагментов ДНК, а также применении молекулярно-генетических методов в медицине, в частности, в кардиологии.

Получение образцов ДНК (или РНК) – первый этап всех молекулярно-генетических методов. Он включает выделение всей ДНК (тотальной или геномной) из клеток или накопление определенных фрагментов, которые предполагается анализировать. ДНК выделяют методом экстракции различными способами с помощью: диоксида кремния (силики); растворителей органического происхождения; ионной смолы; гель-фильтрации на фильтрах из бумаги или на микроцентрифужных колонках [2].

Получить геномную ДНК можно из любой клетки, имеющей ядро. Выделенная ДНК называется геномной, так как она представляет собой весь геном организма. Для получения образцов чаще всего используют кровь из вены, содержащую лейкоциты, или, например,

амниотические клетки, хорион, культуры фибробластов. Для проведения анализа достаточно иметь всего лишь несколько нанограммов или микрограммов ДНК. Для этого необходимо незначительное количество любого биологического материала (например, от 20 до 40 мг хориона, до 1 мл крови, около 5-10 мг культуры клеток, соскоб эпителия со слизистой оболочки щеки или несколько волосяных луковиц). Важно отметить, что полученный образец ДНК долго может сохраняться в замороженном состоянии [1].

Рестрикция ДНК на фрагменты – необходимый этап молекулярно-генетической диагностики, осуществляется рестриктазами, которые представляют собой ферменты, разрезающие ДНК в строго определенном месте (сайте). Их выделяют из клеток бактерий разных видов. В генетике человека используют несколько десятков разных рестриктаз (EcoRI, RsaI, HpaII, Ksp22I и др.). Они способны разрывать двухцепочечную ДНК в пределах строго определенных для каждого фрагмента последовательностей. При обработке геномной ДНК определенной рестриктазой получается закономерный для данного фермента набор фрагментов различной длины.

В большинстве случаев для успешной диагностики болезни достаточно исследовать небольшой фрагмент генома. Необходимо получить достаточное количество таких фрагментов, то есть амплифицировать (умножить) их. Открытие этой реакции совершило революцию в изучении генома человека и молекулярно-генетической диагностике наследственных болезней. Амплификация – это накопление одинаковых фрагментов ДНК. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – метод амплификации ДНК *in vitro* (рис. 1). За несколько часов можно размножить определенную последовательность ДНК в количестве, превышающем исходное в миллион раз и более. Следовательно, исходно требуется незначительное количество материала [7].

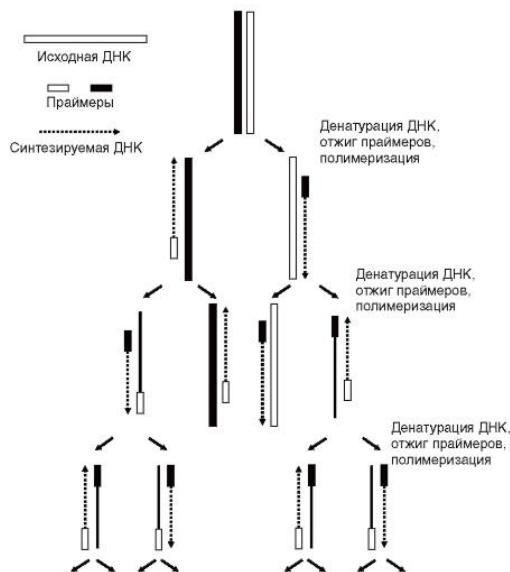


Рис. 1. Полимеразная цепная реакция (ПЦР).

В соответствии с нуклеотидной последовательностью концов 5' и 3' исследуемого участка синтезируется два олигонуклеотидных праймера длиной 20-30 нуклеотидов. Каждый цикл амплификации включает три этапа, протекающих в различных температурных режимах. На первом этапе происходит денатурация ДНК при температуре около 95°C и длится до 40 секунд. Второй этап представляет собой отжиг, или присоединение праймеров согласно принципу комплементарности к соответствующим последовательностям на противоположных цепях ДНК на границах соответствующего участка. Для каждого праймера определена своя температура отжига, значения которой колеблются в интервале от 50 до 65 градусов продолжительностью от 20 до 60 секунд. На третьем этапе осуществляется элонгация, или достраивание цепи при 70°C в течение 20-40 секунд. Достраивание цепей начинается с места присоединения праймеров и происходит комплементарно от 5'-конца к 3'-

концу в противоположных направлениях. Новые цепи синтезируются с помощью нуклеотидов, которые добавляют в раствор. Цепочки ДНК, образовавшиеся в первом цикле, выступают в качестве матриц для последующего цикла. Так ампликоны накапливаются в растворе по формуле 2^n , где n - количество циклов амплификации. Таким образом, несмотря на то, что в исходном растворе могла находиться только одна двухцепочечная молекула ДНК, за 35 - 40 циклов количество молекул возрастет до 10^8 . Такого количества материала достаточно для того, чтобы достоверно визуализировать исследуемый фрагмент. Амплификацию проводят в специальном программируемом приборе - термостате, или амплификаторе. Он производит смену температур согласно числу циклов амплификации.

Идентификацию фрагментов ДНК осуществляют несколькими способами, один из них – электрофорез фрагментов ДНК, который обеспечивает их разделение при их специфическом распределении на поверхности агарозного или полиакриламидного геля. Фрагменты ДНК движутся в геле, помещенном в постоянное электрическое поле, от отрицательного полюса к положительному в зависимости от размеров (чем больше относительная молекулярная масса фрагмента, тем медленнее он движется в электрическом поле). После окончания электрофореза каждый фрагмент ДНК занимает определенное положение в виде дискретной полосы в конкретном месте геля. Длину каждого фрагмента можно определить путем сравнения пройденного фрагментом расстояния с расстоянием, пройденным стандартным образцом ДНК-маркером. Для визуализации результатов экспериментов гели окрашивают этидия бромидом, который связывается с ДНК. Полосы, соответствующие фрагментам ДНК, выявляются при ультрафиолетовом облучении геля.

Другой способ идентификации фрагментов ДНК – метод FISH, представляющий собой флуоресцентную гибридизацию *in situ*. Он применяется для определения местоположения определенной последовательности ДНК на метафазных хромосомах или в интерфазных ядрах *in situ*. При данном методе FISH возможно использование ДНК-зондов, позволяющих выявить специфические последовательности различных участков хромосом. При этом зонд, присоединяясь к комплементарным последовательностям на хромосомах, помечает некоторую область на хромосоме, видимую в флуоресцентный микроскоп. Метод FISH позволяет выявлять не только количественные хромосомные нарушения (анеуплоидии), но и определять микроделеции, сложные транслокации, а также анализировать генные амплификации (например, ERBB2 при раке молочной железы или N-MYC в нейробластомах), картировать впервые выделенные гены и устанавливать их локус на хромосоме.

Еще одним способом идентификации конкретных фрагментов ДНК является блот-гибридизация по Саузерну. Идентификацию конкретных фрагментов в геле среди геномной ДНК провести трудно из-за больших размеров генома человека. После рестрикции образуется так много рестриктных фрагментов, что агарозный гель после электрофореза и окраски этидия бромидом в ультрафиолетовых лучах выглядит равномерно окрашенным. Выявить специфические фрагменты ДНК стало возможно путем блот-гибридизации по Саузерну. Эта методика состоит из нескольких этапов (рис. 2).

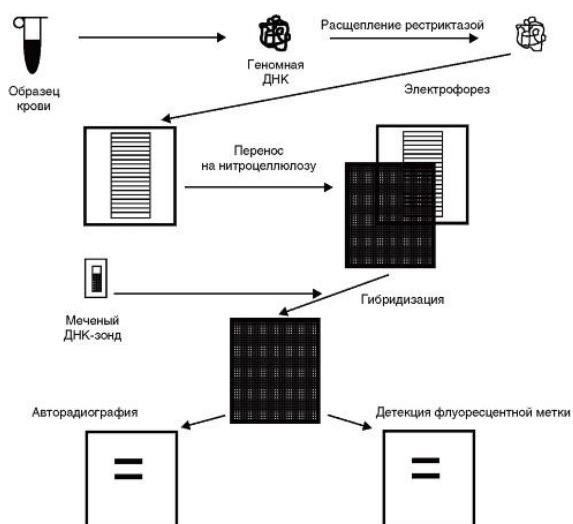


Рис. 2. Блот-гибридизация по Саузерну.

После окончания электрофореза гель помещают в раствор щелочи, в котором двухцепочечные фрагменты ДНК теряют связи и становятся одноцепочечными. Далее ДНК с геля переносят в буферном растворе на нитроцеллюлозный или нейлоновый фильтр. Непосредственно на поверхность геля кладут фильтр и стопку фильтровальной бумаги. В результате капиллярного эффекта создается ток буфера, перпендикулярный плоскости геля. Вымываемая из геля ДНК задерживается фильтром и практически полностью оказывается на его поверхности. После переноса одноцепочечные нити фиксируют на фильтре. Расположение фрагментов на фильтре точно соответствует их расположению в геле. Для того чтобы визуально выявить нужные фрагменты (фиксированная на фильтре ДНК не видна), проводят гибридизацию со специфическим по нуклеотидной последовательности меченым радионуклидом, флуоресцентной меткой олигонуклеотидным синтетическим зондом или клонированным фрагментом ДНК. Нуклеотидная последовательность зонда должна быть полностью или частично комплементарна изучаемому участку геномной ДНК. При инкубации фильтра с раствором, содержащим меченый зонд, происходит гибридизация комплементарных цепей ДНК зонда и фрагмента на фильтре. Неспецифически связанные молекулы зонда отмываются с помощью специальной процедуры. Радиоактивно меченные участки выявляют путем экспонирования фильтра с рентгеновской пленкой (авторадиография). После проявления на пленке видны полосы меченной зондом ДНК. Нерадиоактивные метки визуализируют с помощью флуоресценции или опосредованно с помощью антител. Блот-гибридизацию по Саузерну используют для выявления заболеваний, вызванных длинными тринуклеотидными экспансиями, например, синдрома Мартина-Белл (ломкой X-хромосомы) и для диагностики лимфомы.

Использование ПЦР с разделением фрагментов электрофорезом позволяет выявлять делеции и вставки в генах. При делециях после ПЦР получают фрагменты, длина которых меньше длины нормальных генов, а при дупликациях - больше. В случае замены оснований длина фрагментов остается неизменной, и для их выявления применяют метод полиморфизма длины рестрикционных фрагментов и секвенирование. Значительное число нуклеотидных замен приводит к появлению в последовательности ДНК новых сайтов для различных рестриктаз. В результате нормальный фрагмент ДНК и фрагмент с заменой нуклеотида будут разрезаться одной рестриктазой на разное число фрагментов, отличающихся по длине. Различной длины фрагменты легко выявляются при помощи электрофореза. Примером может служить рестрикционный анализ фрагмента гена алкогольдегидрогеназы (ADH). После ПЦР образуется фрагмент 165 нуклеотидных пар (н.п.). Аллель ADH-1 не несет замены, после его обработки рестриктазой MaeIII при электрофорезе выявляются 2 фрагмента (98 и 68 н.п.). Аллель ADH-2 несет нуклеотидную замену (при замене образуется лишний сайт для рестриктазы) и после рестрикции разрезается на 3 фрагмента (63, 36 и 68 н.п.).

Идентифицировать фрагменты ДНК можно также путем секвенирования. Метод позволяет определять аллельные варианты генов, а также различные типы генных мутаций (чаще по замене оснований), поэтому используется для изучения генома человека как в норме, так и в патологии. [6]. Существует несколько различных способов секвенирования ДНК. Первым был предложен химический метод Максама-Гилберта, затем ферментативный метод Сенгера.

В настоящее время в основном применяется дидезоксинуклеотидный метод секвенирования ДНК (метод обрыва цепи). В этой процедуре одноцепочечная молекула ДНК служит матрицей для синтеза серии комплементарных цепей, обрывающихся в момент присоединения к растущей цепи специфических нуклеотидов. Для обрыва синтеза используют дидезоксинуклеотиды – искусственно синтезированные нуклеотиды, лишенные 2' и 3'-гидроксильных групп и поэтому не способные присоединять к цепи следующий нуклеотид. Проба ДНК делится на 4 пробирки, в которые добавляют праймер, ДНК-полимеразу, смесь четырех трифосфатов (дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ) и небольшое количество одного из дидезоксирибонуклеотидов (ддАТФ, ддГТФ, ддТТФ, ддЦТФ). Во время синтеза ДНК-полимеразы случайным образом включает в цепь нормальные нуклеотиды и дидезоксинуклеотиды. При этом в каждой пробирке образуется набор фрагментов разной длины, заканчивающихся на один из дидезоксинуклеотидов. После этого проводится электрофорез, позволяющий разделить отличающиеся на один нуклеотид фрагменты ДНК. В результате в геле образуется набор полос, напоминающих лестницу. Нуклеотидная последовательность ДНК читается в геле снизу вверх, согласно направлению 5'-3' цепи ДНК. Для определения нуклеотидной последовательности больших фрагментов ДНК используются автоматизированные машины (ДНК-секвенаторы).

Молекулярно-генетические методы нашли широкое применение в медицине. Во-первых, стала возможной идентификация различных мутаций в отдельном гене. Примером выявления дефектного гена может служить диагностика серповидно-клеточной анемии на стадии эмбрионального развития. С помощью рестриктаз получают фрагменты ДНК здорового и больного, затем сравнивают их при помощи гибридизации по Саузерну, используя в качестве зонда радиоактивно меченую ДНК гена Р-глобина. Во-вторых, эти методы лежат в основе точной диагностики моногенных болезней. Это осуществляется путем определения нуклеотидной последовательности генов (гемофилия, гемоглобинопатия) и выявления генов, имеющих мутацию (фенилкетонурия, муковисцидоз). Перечисленные методы и их модификации позволили анализировать генетический полиморфизм ДНК родителей и детей, проводить идентификацию личности человека. Выделение, синтез и клонирование генов является одним из этапов генной инженерии.

Особый интерес представляет использование методов генетической диагностики в кардиологии с целью выявления причин моногенных патологий, таких как врожденные нарушения ритма, кардиомиопатии, некомпактный миокард левого желудочка, синдром Марфана, синдром Бругада, синдром удлиненного интервала QT) [3]. Вместе с тем, высокая стоимость и трудоемкость проведения генетической диагностики при моногенной патологии продиктовала необходимость формулировки четких клинических показаний к проведению генетического тестирования в кардиологии. Генетическая диагностика редко используется для подтверждения диагноза, поскольку большинство заболеваний имеют четкую клиническую картину и постановка диагноза возможна без генетических исследований. В то же время знание о наличии определенного генетического дефекта позволяет проводить каскадное скрининговое обследование членов семьи больного для выявления у них заболевания на доклиническом уровне. Появляется возможность избежать систематического наблюдения у кардиолога тем членам семьи, у которых нет генетического дефекта и которые не имеют риска развития заболевания. Это позволяет разрешить психологическую напряженность и тревогу в семье, где имелись случаи тяжелого наследственного заболевания и внезапной смерти, а также дать рекомендации относительно изменения образа жизни и занятия физкультурой и спортом.

В настоящее время вопрос о проведении генетической диагностики может рассматриваться для следующих заболеваний: синдром удлиненного интервала QT, катехолазависимая желудочковая тахикардия, синдром Бругада, синдром укороченного интервала QT, фибрилляция предсердий, гипертрофическая кардиомиопатия, дилатационная кардиомиопатия, аритмогенная кардиомиопатия, некомпактный миокард левого желудочка, случаи внезапной остановки сердца.

В качестве примера можно привести катехолазависимую желудочковую тахикардию – генетически обусловленное заболевание с возникновением жизнеугрожающих эпизодов желудочковой тахикардии на фоне адренергической стимуляции (физической нагрузке). Дебют заболевания в виде обморочных состояний и внезапной смерти развивается в детском или подростковом возрасте, чаще в 8-10 лет. Диагноз подтверждается при проведении теста с физической нагрузкой, при котором провоцируется эпизод желудочковой тахикардии. Заболевание связано с мутациями в гене рианодинового рецептора, контролирующего высвобождение ионов кальция в кардиомиоцитах и обеспечивающего процесс возбуждение/сокращение. Учитывая крайне высокий риск внезапной смерти и тот факт, что в покое нет проявлений заболевания, генетический скрининг является единственным надежным способом подтвердить или опровергнуть наличие заболевания у членов семьи пробанда. Установка диагноза служит показанием к постановке кардиовертера-дефибриллятора, что спасает человеку жизнь.

Другим примером является гиперкоагуляция крови (тромбофилия) – нарушение свертываемости крови, приводящее к образованию тромбов. Возникает из-за мутации фактора V (мутация Лейдена). Мутация Лейдена – это изменение одного или двух (гетеро-, гомозигота) участков в гене, кодирующем активность V фактора свертывания крови, проакцелерина. В результате F5 становится устойчивым к воздействию протеина C – естественного антикоагулянта, нарушаются противотромботические механизмы крови и организм находится в постоянной тромботической готовности. Патология присутствует у человека с рождения, но дает о себе знать только в зрелом возрасте или под воздействием «провоцирующих» факторов – травмы, длительной иммобилизации во время болезни или после операции, длительного перелета (более 4 часов), при наступлении беременности. До этого момента клинические проявления носительства мутации обычно отсутствуют. У мужчин чаще проявляется в образовании тромбов в венах нижних конечностей, а у женщин из-за этого нарушения возникают проблемы при беременности (невынашивание плода, выкидыши, преждевременные роды). Показаниями к сдаче анализов на мутацию Лейдена являются: планирование беременности; прием пероральных контрацептивов, ЗГТ при климаксе; рецидивирующие тромбозы у пациентов младше 50 лет; отягощенный семейный анамнез; плановое хирургическое вмешательство.

Таким образом, внедрение молекулярно-генетических технологий является важнейшим элементом в развитии персонализированной медицины, предполагающей назначение лекарственных препаратов в зависимости от конкретных мишеней для их воздействия. Это абсолютно новый для медицины подход создает условия не только для существенного снижения смертности, но и для улучшения результатов высокотехнологичных вмешательств, например, на сердце и сосудах.

Литература:

1. Епринцев А.Т., Попов В.Н., Федорин Д.Н. Идентификация и исследование экспрессии генов. // Учебно-методическое пособие для ВУЗов. – Воронеж. – 2008. – 63 с.
2. Кулмамабетова Г. Пробоподготовка. Методы выделения ДНК/РНК // Современные проблемы биологии, ЕНУ, Астана, 2012, Лекция 9.
3. Кумар, В. Основы патологии заболеваний по Роббинсу и Катрану / Кумар В., Аббас А.К., Фаусто Н., Астер Дж. К.; Логосфера, 2014. – 624 с

4. Мутовин Г.Р. Клиническая генетика. Геномика и протеомика наследственной патологии: учебное пособие. М. 2010. – 832 с
5. Нургалиева А.Х., Карунас А.С., Хусаинова Р.И., Хидиятова И.М., Ахметова В.Л., Валиев Русл.Р., Надыршина Д.Д., Мустафин Р.Н., Мурзабаева С.Ш., Хуснутдинова Э.К. Молекулярно-генетические методы изучения наследственных болезней человека: учеб. пособие – Уфа: РИЦ БашГУ, 2013. – 102с.
6. Сукачев М. Современные методы полногеномного секвенирования (расшифровки) ДНК в диагностике и лечении заболеваний // <http://innoros.ru/publications/articles/13/>
7. VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM (2008). «Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis». Biotechniques 44: 619–626. DOI: [10.2144/000112776](https://doi.org/10.2144/000112776)