Министерство здравоохранения Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования

РОССИЙСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ НЕПРЕРЫВНОГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ

Н.С. ДЕМИКОВА, Е.Е. БАРАНОВА

ПОКАЗАНИЯ К ПОЛНОГЕНОМНОМУ СЕКВЕНИРОВАНИЮ У БОЛЬНЫХ С ПОДОЗРЕНИЕМ НА НАСЛЕДСТВЕННЫЕ РЕДКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Москва
2022

РМАНПО

РОССИЙСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ
НЕПРЕРЫВНОГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ

Министерство здравоохранения Российской Федерации
Федеральное Государственное бюджетное образовательное учреждение
дополнительного профессионального образования
РОССИЙСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ НЕПРЕРЫВНОГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ

УТВЕРЖДЕНО

Решением Учебно-методического
Совета ФГБОУ ДПО РМАНПО
Минздрава России

«27» декабря 2022 г.

ПОКАЗАНИЯ К ПОЛНОГЕНОМНОМУ СЕКВЕНИРОВАНИЮ У БОЛЬНЫХ С ПОДОЗРЕНИЕМ НА НАСЛЕДСТВЕННЫЕ РЕДКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Учебное пособие

Москва
2022

УДК
ББК
С-

Организация-разработчик – ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России (ректор – академик РАН, профессор, д.м.н. Д.А. Сычёв).

Показания к полногеномному секвенированию у больных с подозрением на наследственные редкие заболевания: Учебное пособие. /Демикова Н.С., Баранова Е.Е. ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России. – М.: ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, 2022. – 102 с. ISB. - М.: ФГБОУ ДПО РМАНПО, 2022. 99 с. ISBN

Цель учебного пособия - представить современную информацию по показаниям к полногеномному секвенированию у больных с подозрением на наследственные редкие заболевания, сформировать понимание сущности технологии NGS и ее возможностей в клинической практике. Содержание учебного пособия соответствует содержанию основной профессиональной образовательной программы высшего образования – подготовке кадров высшей квалификации в ординатуре и содержанию дополнительной профессиональной программы переподготовки врачей по специальностям «Генетика», «Лабораторная генетика».

В учебном пособии приводится общая информация по полногеномному секвенированию следующего поколения на основе технологий NGS, по основам биоинформатической обработки данных NGS, возможности и ограничения метода, базы данных. Отдельная глава посвящена применению метода в клинической практике: в неврологии, кардиологии, дизморфологии, при нарушениях слуха и зрения, а также при недиагностированных редких заболеваниях.

Данное пособие разработано и подготовлено сотрудниками кафедры медицинской генетики в соответствии с системой стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу.

Учебное пособие предназначено для врачей-генетиков, врачей-лабораторных генетиков, а также ординаторов, аспирантов медицинских ВУЗов, слушателей циклов повышения квалификации врачей по указанным специальностям. Рубрикация по МКБ-10: Класс VI – Болезни нервной системы; Класс IX - Болезни системы кровообращения; Класс XVII - Врожденные аномалии [пороки развития], деформации и хромосомные нарушения.

УДК
ББК

Табл.2. Рис. 6. Библиогр.: 40 назв.

Рецензенты:

Зав. кафедрой детской неврологии ФГБОУ РМАНПО Минздрава России, профессор, д.м.н. **В.П. Зыков**

Профессор кафедры медицинской генетики ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, профессор, д.м.н. **А.Ю. Асанов**

По инициативе Благотворительного фонда медико-социальных генетических проектов помощи «Геном жизни» (БФ «Геном жизни»)

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДПЖ – аритмогенная дисплазия правого желудочка

АПЖК – аритмогенная правожелудочковая кардиомиопатия

АРГА – аневризма и расслоение грудной аорты

ВПР – врожденный порок развития

ВПС – врожденный порок сердца

ГКМП – гипертрофическая кардиомиопатия

ДКМ – дилатационная кардиомиопатия

ДКМП – дилатационная кардиомиопатия

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

КПЖТ – катехоламинергическая полиморфная желудочковая тахикардия

ЛБН – лизосомные болезни накопления

МВПР – множественные врожденные пороки развития

МРТ – магнитно-резонансная томография

НЛЖ – некомпактность левого желудочка

НМЗ – нейромышечные заболевания

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РАС – расстройства аутистического спектра

РНК – рибонуклеиновая кислот

СБ – синдром Бругада

СГХ – семейная гиперхолестеринемия

УО – умственная отсталость

ФП – фибрилляция предсердий

ХМА – хромосомный микроматричный анализ

ЦНС – центральная нервная система

ЭМГ – электромиография

ACMG – the American College of Medical Genetics and Genomics (Американская коллегия медицинской генетики и геномики)

AMP – association for Molecular Pathology (Ассоциация молекулярной патологии)

CAP – college of American Pathologists (Колледж американских патологов)

CGH – comparative genomic hybridization (сравнительная геномная гибридизация)

CNV – copy number variation (вариация числа копий)

FISH – fluorescence in situ hybridization (флуоресцентная гибридизация in situ)

MLPA – multiplex ligation-dependent probe amplification (мультиплексная лигандно-зависимая амплификация)

NGS – next generation sequencing (секвенирование следующего поколения)

SBS – sequencing-by-synthesis (секвенирование путем синтеза)

SNV – single nucleotide variant (однонуклеотидный вариант)

WGS – whole genome sequencing (секвенирование всего генома)

WES – whole exome sequencing (секвенирование всего экзома)

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 6
ГЛАВА 1. ПОЛНОГЕНОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ МЕТОДОМ NGS – ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ, ВОЗМОЖНОСТИ И ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА 8
1.1. Полногеномное секвенирование на основе технологии next generation sequencing (NGS): используемые платформы 8
1.2. Возможности полногеномного секвенирования методом NGS 17
1.3. Ограничения и случайные находки при полногеномном секвенировании 21
1.4. Особенности анализа в формате «моно», «дуо», «трио» 23
1.5. Валидация результатов полногеномного секвенирования 24
Контрольные вопросы и задания 24
ГЛАВА 2. ОСНОВЫ БИОИНФОРМАТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ ДАННЫХ NGS 25
2.1. Оценка патогенности (по рекомендациям American College of Medical Genetics and Genomics) 25
2.2. Базы данных 26
2.3. Как понять заключение? 28
Контрольные вопросы и задания: 31
ГЛАВА 3. КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ СЕКВЕНИРОВАНИЯ СЛЕДУЮЩЕГО ПОКОЛЕНИЯ В МЕДИЦИНЕ 32
3.1. Секвенирование нового поколения в неврологии 32
3.2. Секвенирование нового поколения в кардиологии 48
3.3. Секвенирование нового поколения в дизморфологии 64
3.4. Секвенирование нового поколения при нарушениях слуха и зрения 74
3.5. Общий подход применения NGS при недиагностированных редких заболеваниях 78
Контрольные вопросы и задания: 88
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 90
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 92

ВВЕДЕНИЕ

Расшифровка всего генома в рамках проекта «Геном человека» (1990-2003 гг.) потребовала совместных усилий сотен ученых из 20 исследовательских центров и продолжалась более 13 лет. На проведение секвенирования было потрачено около 3 миллиардов долларов.

В настоящее время полногеномное секвенирование (WGS – whole genome sequencing) – важный инструмент, который используется и в научно-исследовательской работе, и в практическом здравоохранении.

Секвенирование генома человека изменило наше понимание генетической изменчивости и ее значение для здоровья и болезней, и теперь оно все больше и больше входит в рутинную клиническую практику для диагностики наследственных заболеваний.

Полногеномное секвенирование определяется как технология, позволяющая в одном эксперименте определить последовательность всей ДНК клетки, общий размер которой превышает 3 миллиона пар оснований. Этот метод включает анализ как экзонных (кодирующих) областей, так и интронных (некодирующих) областей ДНК. Секвенирование всего генома обеспечивает расширенный анализ различных генетических вариантов, включая однонуклеотидные варианты (SNV – single nucleotide variants), вариации числа копий (CNV - copy number variation) или структурные варианты и экспансию повторов.

Следует подчеркнуть, что полногеномное секвенирование на основе технологии секвенирования следующего поколения (NGS) позволяет секвенировать геном за относительно короткий промежуток времени. Высокая производительность, характерная для NGS, достигается за счет массивного параллельного подхода, позволяющего в зависимости от используемой платформы, секвенировать от десятков тысяч до более чем миллиарда молекул одномоментно. Преимущество в скорости, которое дает полногеномное секвенирование на основе NGS, имеет критически важное значение. Использование полногеномного секвенирования может быть эффективным

для диагностики на ранних стадиях редких заболеваний, до 80% которых имеют генетическую природу. Своевременная и точная диагностика дает возможность принятия адекватных терапевтических решений для предотвращения прогрессирования заболевания у больного, помочь в оценке генетического риска повторения заболевания в семье.

Полногеномне секвенирование может быть полезно в клинической практике целого ряда медицинских направлений: в кардиологии, неврологии, онкологии, педиатрии и других областях медицины. Кроме того, исследование генома открывает новые возможности для развития персонализированной медицины.

Цель написания учебного пособия - сформировать понимание сущности технологии полногеномного секвенирования на основе NGS и его возможностей в повседневной клинической практике не только у врачей-генетиков и врачей-лабораторных генетиков, но и у врачей других специальностей, а также ординаторов и аспирантов медицинских ВУЗов.

ГЛАВА 1. ПОЛНОГЕНОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ МЕТОДОМ NGS – ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ, ВОЗМОЖНОСТИ И ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

1.1. **Полногеномное секвенирование на основе технологии next generation sequencing (NGS): используемые платформы**

История определения последовательности нуклеотидов или секвенирования берет начало от секвенирования по Сэнгеру, с помощью которого в настоящее время проводят анализ до 1-10 генов или их фрагментов к секвенированию нового поколения (Next-generation sequencing – NGS) или массивному-параллельному/высокопроизводительному секвенированию, позволяющему секвенировать молекулу ДНК общим размером, значительно превышающим 1 миллион пар оснований, а значит выполнять исследования генетических панелей (от 10–100 генов и выше) и секвенирование экзома, где осуществляется анализ ~20000 генов, кодирующих белок. Сейчас NGS также применяется в различных областях, таких как секвенирование генома de novo, ресеквенирование генома, анализ транскриптома, целевое повторное секвенирование, секвенирование малых РНК и микроРНК. Эта технология, в отличие от появившейся ранее технологии секвенирования по Сэнгеру, позволяет в более короткие сроки и с меньшими финансовыми затратами секвенировать геном полностью.

Полногеномное секвенирование (whole genome sequencing – WGS) представляет собой лабораторный метод, включающий анализ всей геномной ДНК, включая **кодирующие экзонные области и некодирующие интронные области, а также митохондриальную ДНК**.

По Steven L. Salzberg, **ген – фрагмент ДНК, который транскрибируется в РНК, а затем транслируется или не транслируется в белок**. В настоящее время у человека ориентировочно насчитывается более **20 тысяч белок-кодирующих генов и 30 тысяч транскриптов**. Полногеномное секвенирование позволяет оценить последовательность всех генов.

Технология NGS произвела революцию в области биологических наук, продемонстрировав возможности скоростного секвенирования ДНК с высокой пропускной способностью, позволяющей секвенировать геномы несколько человек одновременно. Важным открытием в секвенировании генома человека стало выявление большого количества различий между индивидуальными геномами человека.

Для NGS в настоящее время используется ряд различных платформ, основанных на разных технологиях секвенирования. Важной характеристикой основных используемых на сегодняшний день платформ NGS является ограниченная длина последовательности, то есть ограниченная длина считывания. Несмотря на постоянные усовершенствования, длина считывания для большинства платформ остается в диапазоне сотен пар оснований. Для секвенирования ДНК, длина которой превышает возможную длину считывания, материал перед анализом фрагментируется. После секвенирования проанализированные фрагменты собираются in silico (с помощью компьютерного моделирования), чтобы получить информацию о последовательности исследуемой молекулы-мишени.

Особенностью секвенирования следующего поколения является многократное секвенирование каждого основания в исследуемой последовательности ДНК. Количество раз, когда данная позиция была секвенирована в эксперименте NGS (т.е. количество чтений, содержащих эту позицию), называется покрытием. С одной стороны, множественное покрытие является следствием случайной фрагментации ДНК, вызванной короткой длиной считывания. С другой стороны, получение множества считываний, покрывающих один и тот же фрагмент, необходимо для устранения случайных ошибок секвенирования. Достаточное покрытие важно для хорошего качества эксперимента NGS. **Покрытие**, которое иногда также называют «**глубиной» секвенирования**, может быть определено «средним покрытием», то есть суммой покрытий для всех нуклеотидов в исследуемой последовательности, деленной на количество нуклеотидов. Среднее покрытие дает общее

представление о структуре эксперимента, но оно может быть ошибочно высоким, если некоторые регионы покрыты чрезмерно, а другие - слабо или вообще не покрыты. Более информативный способ охарактеризовать покрытие - рассчитать, какой процент исследуемой последовательности был секвенирован с заданной (или большей) глубиной, которая считается удовлетворительной. Разумным результатом при поиске генетических вариантов (например, мутаций, вызывающих заболевания, которые, как ожидается, будут присутствовать в 50% или 100% соответствующим образом расположенных считываний) является **покрытие более 80% минимум 20 раз в случае полногеномного секвенирования**.

Все платформы NGS выполняют параллельное секвенирование миллионов небольших фрагментов ДНК. Биоинформатический анализ позволяет впоследствии собрать воедино эти фрагменты путем сопоставления отдельных прочтений с эталонным геномом. NGS можно использовать для секвенирования полных геномов и экзомов или для определенных частей генома, представляющих интерес в рамках конкретного исследования.

Платформа Life sciences 454 компании Roche – первая коммерческая платформа для секвенирования, основанная на **принципе пиросеквенирования**.

Подготовка образцов включает расщепление молекулы ДНК с использованием высокого давления, после этого к фрагментам ДНК длиной около 1000 п.н. присоединяют разные по последовательности адаптеры и проводят эмульсионную ПЦР с целью клональной наработки фрагментов ДНК. Далее сферы с молекулами ДНК помещают в матрицу так, чтобы в каждую ячейку попало по одной сфере. Матрицу помещают в секвенатор и, при последовательном добавлении четырех нуклеотидов, производят детекцию свечения от каждой ячейки (Рис. 1).

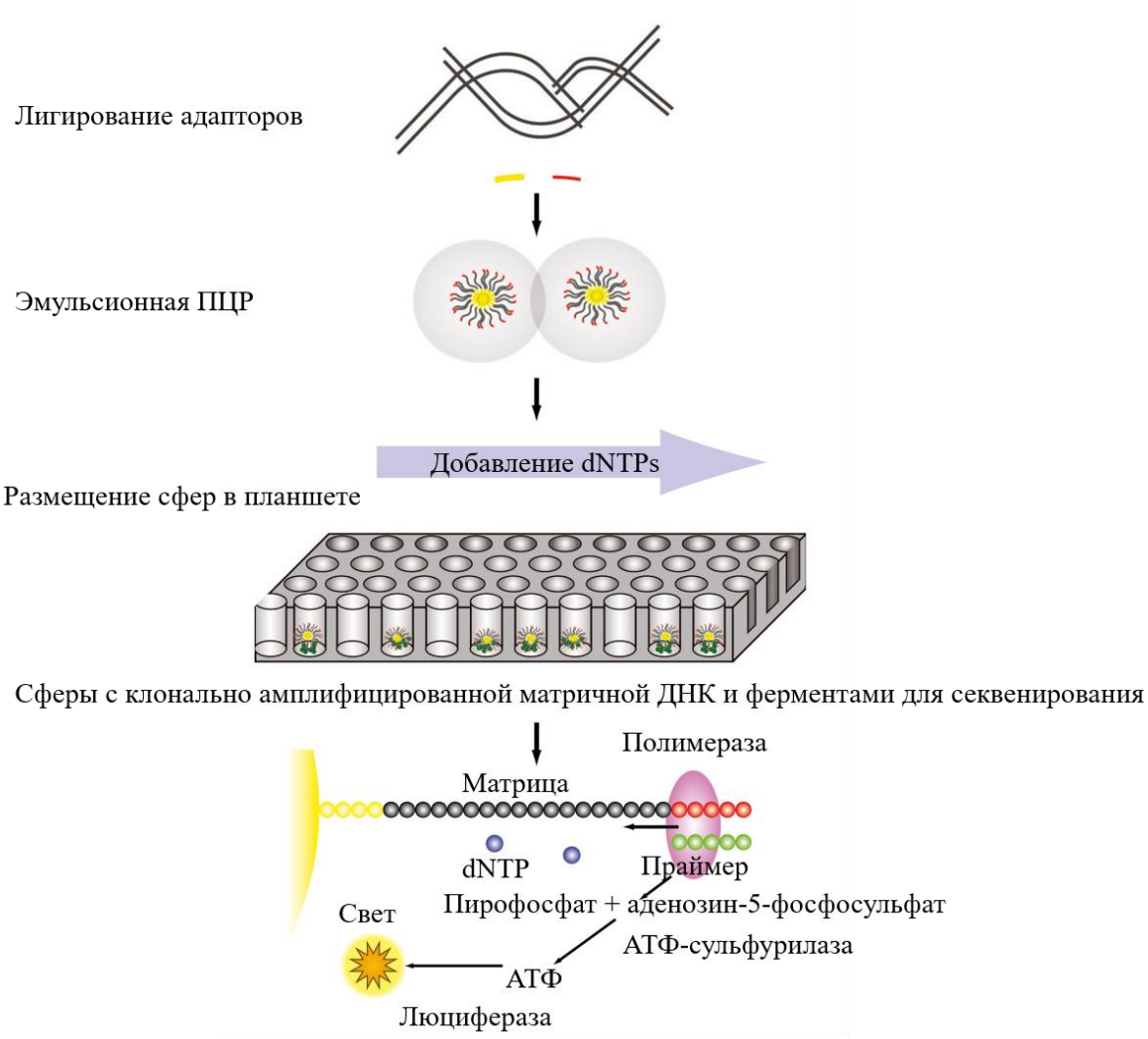


Рисунок 1. Принцип пиросеквенирования

Одна из технологических проблем – точность определения гомополимеров (повторяющихся нуклеотидов).

Линейка секвенаторов – 2 прибора, с одного можно получать до 1 млн прочтений **длиной около 800-1000 п.н., со второго – до 100 тысяч прочтений длиной 600-800 п.н.** С 2016 года компания Roche перестала поддерживать данную платформу из-за того, что появились более производительные и недорогие технологии.

Платформа Illumina основана на флуоресцентном секвенировании отдельных молекул ДНК после клональной амплификации на твердой основе без ПЦР.

В 2006 году компанией Solexa был выпущен первый секвенатор, давший начало коммерческому использованию данной технологии. За один запуск

прибора стало возможно получать **до 1 млрд п.о. или 1 Гб данных.** В 2007 году Solexa приобретена компанией Illumina, в 2011 году выпущен секвенатор HiSeq 2500, позволяющий получать уже 200 Гб данных за один запуск.

В 2022 году Illumina анонсировала выход прибора NovaSeq™ X Series, являющегося самым мощным по производительности из всей линейки приборов компании (Рис. 2).

Рисунок 2. NovaSeq™ X Series

На платформах Illumina секвенирование происходит на поверхности жидкостной камеры (проточной ячейки), разработанной для обеспечения доступа к реагентам и возможности оптической визуализации. Проточная ячейка может иметь до восьми каналов, называемых дорожками, в которых могут размещаться независимые образцы.

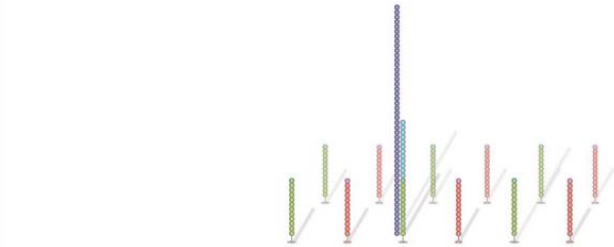
Предпосылкой для секвенирования является связывание подготовленной библиотеки ДНК с проточной ячейкой. Денатурированная (одноцепочечная) и соответствующим образом разбавленная библиотека наносится на проточную ячейку, обеспечивая гибридизацию (нековалентное связывание) между фрагментами ДНК и олигонуклеотидами на поверхности проточной ячейки. В дальнейшем в результате синтеза комплементарной (обратной) нити с последующим вымыванием первоначально связанной нити

ДНК относительная нековалентная связь преобразуется в прочную ковалентную связь.

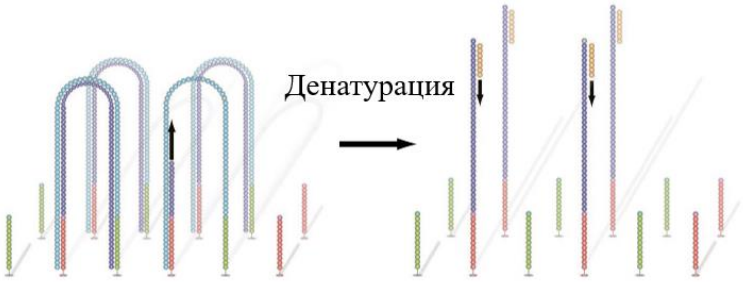
Следующим шагом является мостиковая амплификация - циклический процесс, в ходе которого происходит клональная репликация молекул ДНК, связанных с проточной кюветой, образуя так называемые «кластеры». Во время мостиковой амплификации одноцепочечная молекула переворачивается и образует мостик, в результате гибридизации с соседним, комплементарным праймером. После растяжения полимеразой образуется двухцепочечный мостик, который после денатурации дает обратную копию исходного (прямого) фрагмента ДНК, ковалентно связанного с поверхностью проточной кюветы. Процесс циклически повторяется, и на последнем этапе обратные нити отщепляются, оставляя гомогенный кластер с 1000 прямыми нитями.

Соответствующая плотность кластеров является критически важным фактором успешного секвенирования. Слишком малое количество кластеров снижает производительность секвенирования, в то время как слишком большое количество кластеров приводит к наложениям, что негативно сказывается на качестве данных и в крайних случаях приводит к полному провалу эксперимента.

Собственно секвенирование ДНК на платформах Illumina осуществляется по **технологии секвенирования методом синтеза – sequencing-by-synthesis (SBS)**. Реакция начинается с гибридизации праймера, комплементарного части адаптера с последующими циклами (1) добавления ДНК-полимеразы с четырьмя нуклеотидами, (2) визуализации и (3) расщепления флюорофора и разблокировки (Рис. 3).



Модифицированная адаптером цепь ДНК, гибридизованная с олигонуклеотидным якорем



Образование кластеров посредством мостиковой амплификации

Секвенирование передней (forward) нити ДНК

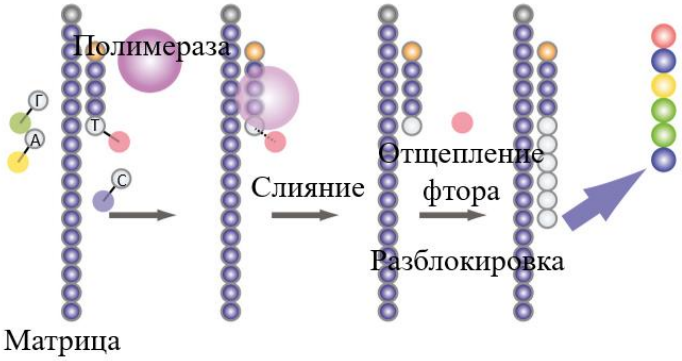


Рисунок 3. Принцип секвенирования методом синтеза (с обратимыми красителями-терминаторами)

Нуклеотиды необратимо блокируются (терминируются) и индивидуально флуоресцентно маркируются, что гарантирует, что во время каждого цикла праймер удлиняется только на одно основание и что это основание может быть идентифицировано по его флуоресценции при соответствующем освещении и сканировании. В зависимости от задач и конкретного прибора можно выполнить 36-301 цикл, что позволяет получить последовательность длиной 35-300 п.н.

Все приборы Illumina поддерживают парное секвенирование. Секвенирование другого конца молекулы ДНК достигается путем удаления нити, синтезированной во время первого считывания, и выполнения одного

цикла мостовой амплификации с расщеплением исходной передней (forward) нити. В результате одноцепочечные молекулы ДНК в каждом кластере превращаются в свои обратные, которые затем секвенируются, как описано выше.

Платформа BGI/MGI

Пекинский институт геномики (Beijing Genomics Institute, BGI) – один из крупнейших в мире центров генетических исследований, имеющий подразделение MGI Tech Co., Ltd (MGI) по производству линейки секвенаторов нового поколения. Общий рабочий процесс, процедуры пошагового секвенирования и точность определения последовательности ДНК платформ BGI/MGI практически аналогичны таковым в серии приборов Illumina, хотя у двух технологий есть и небольшие отличия. Например, протоколы подготовки библиотек в этих платформах имеют свои особенности. Сходство технологии привело к заметной конкуренции двух компаний, которая благотворно сказалась на стоимости секвенирования. В частности, в 2017 году BGI предлагала секвенирование полного генома (только данные) всего за $600. В 2019 году был анонсирован сверхвысокопроизводительный генетический секвенатор DNBSEQ-T7, **генерирующий 6 ТБ и позволяющий секвенировать до 60 полных геномов человека в день** (Рисунок 4).

Рисунок 4. DNBSEQ-T7

Помимо двух наиболее распространенных платформ Illumina и BGI/MGI, которые описанных выше, часто используется также **полупроводниковая платформа**.

Работа **полупроводниковой платформы** основана на обнаружении изменений pH, происходящих во время синтеза ДНК. Секвенирование выполняется после одномолекулярной амплификации – эмульсионной ПЦР. Впервые полупроводниковый секвенатор (Ion PGM) был разработан в 2010 году компанией Ion Torrent Inc. Его усовершенствованная версия была выпущена в 2012 году под названием «Ion Proton». А в 2013 году на рынке появилась Ion Chef, преимущество которой состоит в автоматизированном процессе пробоподготовки. Однако у технологии есть существенные ограничения. В частности, проблематичным остается чтение гомополимеров: при повторе 5 и более одинаковых оснований точное число нуклеотидов не подсчитывается, и результат чтения отбраковывается. Из-за этого могут быть пропущены мутации со сдвигом рамки считывания. Но благодаря высокой скорости секвенирования и относительно низкой цене, технология активно используется в тех областях, где точность определения каждого нуклеотида не критична, например, в ПГТ-А (преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии).

Итак, на сегодняшний день, NGS вышло на исторический максимум по производительности, включая скорость выполнения исследования, качеству получаемых данных и на исторический минимум по цене за геном. Уже становятся очевидными технологические и клинические преимущества именно полногеномного секвенирования, которые более подробно будут представлены далее. Немаловажным является также возможность переанализа таких данных при получении новой научной информации.

Ограничением всех существующих технологических платформ NGS является ограниченная длина чтения, не поволяющая, например, анализировать цис-транс положения далеко расположенных вариантов, анализировать сбалансированные перестройки, нарушающие структуру генов,

а также сложность анализа данных в тех случаях, когда имеется большая тканевая гетерогенность (мозаицизм), например в случае онкологических заболеваний.

Технология одномолекулярного секвенирования, также известного как секвенирование третьего поколения, основанная на совершенно других принцапах анализа ДНК, позволяет избежать таких проблем. Технология, например, воплощена в приборах: «Helicos Heliscope» (Helicos BioScience Corporation), «PacBio RS SMRT» (Pacific Biosciences) и «MinION» (Oxford Nanopore).

Нанопоровая технология, воплощенная в аппаратах Oxford Nanopore, **может** со временем **стать альтернативой NGS**: сегодня точность нанопорового секвенирования уже практически сопоставима с точностью NGS. Кроме того, при нанопоровом секвенировании длина прочтений может достигать 100 тысяч п.н., что является значительным преимуществом. Другие плюсы технологии: низкая цена приборов, их небольшой размер (Рисунок 5) и простота эксплуатации.

Рисунок 5. Нанопоровый секвенатор «MinION» (Oxford Nanopore)

Минусы, из-за которых нанопоровое секвенирование пока не нашло применения в широкой клинической практике: большой размер исходных данных и сложность их анализа.

1.2. Возможности полногеномного секвенирования методом NGS

NGS имеет несколько возможностей, которые выгодно отличают его от метода секвенирования по Сэнгеру.

Во-первых, NGS может предоставлять массивные параллельные и высокопроизводительные данные из нескольких образцов за прогон при значительно меньших затратах по сравнению с секвенированием по Сэнгеру. Во-вторых, NGS обеспечивает более точные и надежные данные секвенирования.

Благодаря этим преимуществам NGS стал ценным инструментом для исследователей и клиницистов.

NGS используется для исследования полных геномов с целью обнаружения в том числе совершенно новых, ранее не известных, мутаций и генов, вызывающих заболевания. NGS охватывает более широкий спектр мутаций, чем секвенирование по Сэнгеру. Секвенирование по Сэнгеру ограничивается обнаружением замен, небольших вставок и делеций. Для обнаружения других мутаций необходимо использовать другие методики. Однако определить эти мутации можно непосредственно при помощи секвенирования NGS, использование этой технологии позволяет клиницистам собрать весь спектр геномных вариаций в одном эксперименте.

Повышенная чувствительность NGS позволяет обнаруживать мозаичные мутации. Секвенирование NGS обеспечивает гораздо более точное считывание и может использоваться для идентификации вариантов, которые находятся всего в нескольких процентах клеток, включая мозаичные вариации.

Кроме того, NGS позволяет находить соматические мутации, которые становятся причиной развития злокачественных новообразований, обнаружить редкие генетические варианты и протестировать одновременно большое число генов предрасположенности на наличие клинически значимых мутаций в короткие сроки.

Как было отмечено выше, около 80% редких заболеваний имеют генетический компонент, поэтому использование секвенирования генома может быть эффективным для диагностики и этой группы заболеваний.

NGS вносит свой вклад и в совершенствование персонализированного лечения онкологических заболеваний. Клиническая значимость такого исследования для выбора тактики лечения и назначения соответствующих таргетных препаратов была успешно продемонстрирована в целом ряде работ.

Метод NGS может успешно применяться и для поиска специфических мутаций в циркулирующей опухолевой ДНК в плазме крови. Секвенирование следующего поколения может быть использовано также для обнаружения новых мутаций в циркулирующей опухолевой ДНК, которые возникают с течением времени в процессе терапии и вызывают резистентность опухоли к лечению.

Преимущества полногеномного секвенирования состоят в следующем:

- Полногеномное секвенирование (WGS) позволяет исследовать кодирующие и некодирующие области генома - SNV, вставки, структурные варианты и CNV. WES опускает регуляторные области, такие как промоторы и энхансеры.
- WGS обеспечивает более надежное покрытие последовательности. Различия в эффективности гибридизации зондов захвата WES могут привести к тому, что области генома будут иметь небольшое покрытие или вообще не охватывать его.
- Однородность покрытия при WGS превосходит WES. Области генома с низкой сложностью последовательности ограничивают возможность разработки полезных приманок для захвата WES, что приводит к нецелевым эффектам захвата.
- Не требуется ПЦР-амплификация во время подготовки библиотеки, что снижает вероятность систематической ошибки определения GC, в то время как WES часто требует ПЦР-амплификации, так как для захвата обычно требуется около 1 мкг ДНК.

- Для WGS длина чтения последовательности не является ограничением. Большинство зондов-мишеней для exome-seq имеют длину менее 120 нуклеотидов, следовательно секвенирование с использованием большей длины считывания становится бессмысленным.
- При WGS требуется меньшая средняя глубина считывания для достижения той же широты охвата, что и WES.
- WGS не предвзят, в то время как, зонды захвата WES, как правило, предпочтительно обогащают эталонные аллели в гетерозиготных сайтах, производя ложноотрицательные определения SNV.
- WGS является универсальным. В то время как при секвенировании вида, отличного от человека, выбор для секвенирования экзома довольно ограничен.
- При WGS есть возможность возвращения к данным, их пересмотр.

1.3. Ограничения и случайные находки при полногеномном секвенировании

Мы рассмотрели основные преимущества NGS-технологии, благодаря которым этот метод сегодня широко применяется. Однако у него есть и свои ограничения.

Основные ограничения применения NGS в клинической медицине связаны с техническими недостатками современных технологий: короткая длина считывания, относительно высокая частота ошибок, неполное покрытие. Еще одна проблема – интерпретация полученных данных.

Короткие считывания позволяют идентифицировать SNV и короткие делеции/инсерции, в то время как выявление вариантов, включающих более длинные последовательности, затруднено или невозможно. В частности, с помощью NGS невозможно проанализировать участки коротких тандемных повторов, включая те, которые вызывают клинически важные заболевания. Несмотря на предпринимаемые усилия, по-прежнему трудно обнаружить CNV.

Хромосомные транслокации и анеуплоидии также могут быть пропущены анализами NGS, если они не предназначены специально для выявления таких вариантов.

Наиболее часто используемые платформы NGS имеют частоту ошибок примерно 0,1-1%. Эти показатели ошибок выражаются в тысячах ошибок при проведении обширных анализов, таких как WES или WGS. Проблема усугубляется неслучайным распределением ошибок, что затрудняет коррекцию на основе увеличения охвата.

Относительно высокая частота ошибок создает своеобразные проблемы при обнаружении соматических вариантов, например, при выявлении клинически значимых мутаций в неопластической ткани. Из-за гетерогенности опухоли и контаминации нормальными клетками частота

появления таких мутаций может быть сопоставима с частотой ошибок NGS, что затрудняет или делает невозможным их обнаружение.

Если небольшие (<10 кб) мишени часто могут быть обогащены (обычно с помощью ПЦР) и секвенированы со 100% эффективностью, то это невозможно для более длинных мишеней, анализ которых, как правило, имеет пробелы из-за неполного охвата.

Необходимо помнить о том, что секвенируя весь геном, могут выявляться различные изменения, что, в свою очередь, может привести к дополнительным проблемам. Так, в одном случае можно выявить варианты, указывающие на риск развития онкологического заболевания, но имеющего таргетную терапию. В таком случае находка дает возможность проводить либо профилактические, либо эффективные лечебные мероприятия. Однако при помощи полногеномного секвенирования можно выявить варианты, не связанные с исследуемым основным заболеванием, но имеющие отношение к заболеваниям, которые могут развиться в будущем. Например, могут быть выявлены мутации, связанные с увеличением риска развития болезни Альцгеймера или болезни Паркинсона. Эти потенциально важные с медицинской точки зрения находки, не связанные с основным заболеванием, называют дополнительными, случайными или неожиданными находками. Консенсусной комиссией ACMG было рассмотрено ведение пациентом с дополнительными находками. Учитывая рекомендации ACMG, при выявлении мутации, в отношении которой возможна медицинская помощь, например, профилактическое наблюдение при повышенном риске рака молочной железы в семье, имеющей носителей мутации *BRCA1*, или профилактическое кардиологическое обследование пациентов, несущих мутации в генах синдрома удлиненного интервала QT, и при согласии пациента на получение этих результатов, они будут переданы ему и будут предприняты соответствующие меры.

1.4. Особенности анализа в формате «моно», «дуо», «трио»

Отдельное внимание следует обратить на WGS в формате «трио» и «дуо». Под ними подразумевается секвенирование геномов пробанда, матери и отца, или пробанда и одного родителя – соответственно.

Анализ в формате «трио» предпочтителен во всех случаях при подозрении на редкое наследственное заболевание, но при отсутствии подозрений на конкретную патологию. Формат «дуо» используется, если секвенирование для обоих родителей по тем или иным причинам невозможно.

Секвенирование в формате «трио» предоставляет сразу несколько преимуществ по сравнению с анализом генома только пациента. Во-первых, «трио» дает возможность правильно классифицировать ранее не описанные варианты и варианты в генах-кандидатах. Во-вторых, секвенирование «трио» показывает носительство патогенных мутаций у родителей, что в конечном итоге важно в том числе при планировании последующих беременностей. В-третьих, у секвенирование «трио» есть и научный потенциал: оно позволяет открывать новые гены и ассоциации.

При труднодиагностируемых заболеваниях, в частности, неврологических нарушениях и задержке развития, использование секвенирования «трио» пробанд-родители как теста первой линии может быть клинически и экономически целесообразным. Именно неврология (включая умственную отсталость) - самая крупная медицинская специальность, участвовавшая в проекте «100000 геномов». В рамках проекта общий уровень диагностики составил около 25%, что соответствует постановке генетического диагноза в 25% семей. Необходимо отметить, что диагностический результат был выше, когда для анализа были доступны трио и большие семьи, поэтому сбор образцов от нескольких членов семьи вносит ценный вклад в постановку диагноза.

1.5. Валидация результатов полногеномного секвенирования

Ограничения, описанные в параграфе 1.3., указывают на необходимость подтверждать результаты NGS-тестов, в частности WES и WGS, независимым методом (например, секвенированием по Сэнгеру), а в случае отрицательных результатов всегда следует помнить, что они могут быть ложноотрицательными. Важно отметить, что даже WES или WGS, несмотря на их мощность, не могут быть использованы для исключения вероятности генетического дефекта у пациента.

Для клинической интерпретации результатов необходимо опираться на клиническую картину и корреляцию генотип-фенотип.

Контрольные вопросы и задания

1. Дать определение понятиям полногеномного секвенирования и секвенирования нового поколения?
2. На чем основан принцип действия NGS-платформ?
3. В чем заключается принцип работы платформы Illumina?
4. Каковы преимущества полногеномного секвенирования?
5. Какие возможности дает полногеномное секвенирование?
6. Какие основные ограничения метода NGS?
7. Что представляют собой случайные находки при полногеномном секвенировании?
8. Какие рекомендации дает ACMG при выявлении случайных находок?
9. В каких случаях экономически и клинически целесообразно проведение анализа в формаете «трио»?
10. Как подтвердить результаты NGS-тестирования?

ГЛАВА 2. ОСНОВЫ БИОИНФОРМАТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ ДАННЫХ NGS

2.1. Оценка патогенности (по рекомендациям American College of Medical Genetics and Genomics)

В 2015 году Американский колледж медицинской генетики и геномики (ACMG) выпустил обновленное руководство по интерпретации вариантов последовательностей.

Этот документ был разработан клиницистами и руководителями клинических лабораторий, которые являются экспертами в области клинической генетики и входят в состав ACMG, Ассоциации молекулярной патологии (AMP) и Колледжа американских патологов (CAP). Рекомендации относятся к широкому спектру генетических тестов, используемых в клинических лабораториях, включая генотипирование, отдельные гены, панели, экзомы и геномы.

В документе предлагаются заменить понятия «мутация» и «полиморфизм» на термин «вариант» как более нейтральный. В процессе интерпретации варианты классифицируются на пять типов: патогенные (P - pathogenic), вероятно патогенные (LP - likely pathogenic), неопределенное значение (VUS- variant of uncertain signinсance), вероятно доброкачественные (LB - likely benign) и доброкачественные (B - benign), в зависимости от применяемых критериев. Хотя эти модификаторы могут не охватывать все фенотипы человека, они представляют собой пятиуровневую систему классификации вариантов, относящихся к менделевским заболеваниям.

В документе есть и конкретизация использования понятий «вероятно патогенный» и «вероятно доброкачественный». Эксперты предлагают использовать их для обозначения более чем 90% уверенности в том, что вариант является болезнетворным или доброкачественным.

Кроме того, в рекомендациях ACMG описывается процесс классификации вариантов по этим пяти категориям на основе критериев с

использованием типов данных о вариантах (например, данные о популяции, расчетные данные, функциональные данные, данные о сегрегации).

2.2. Базы данных

В вышеупомянутых рекомендациях ACMG есть и указания по работе с базами данных.

Отмечается, что, хотя базы данных удобны для сбора информации, их следует использовать с осторожностью.

Базы данных населения[1][2][3][4] полезны для получения частот вариантов в больших популяциях. При использовании популяционных баз данных необходимо определить, использовались ли когорты здоровых или больных, и, если возможно, было ли включено в когорту более одного человека из одной семьи, а также возрастной диапазон испытуемых.

Базы данных заболеваний[5][6][7][8][9][10] в основном содержат варианты, обнаруженные у пациентов с заболеванием, и оценку их патогенности. Базы данных по заболеваниям и генам часто содержат неверно классифицированные варианты, в том числе неверные утверждения, опубликованные в рецензируемой литературе. Это связано с тем, что многие базы данных не проводят первичный обзор доказательств.

При использовании баз данных клинические лаборатории должны:

- определить, как часто обновляется база данных, поддерживается ли курирование данных и какие методы использовались для курирования;

[1] https://exac.broadinstitute.org/
[2] https://evs.gs.washington.edu/EVS/
[3] https://ncbi.nlm.nih.gov/snp/
[4] https://ncbi.nlm.nih.gov/dbvar
[5] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/
[6] https://omim.org/
[7] https://www.hgmd.org/
[8] https://www.hgvs.org/
[9] https://www.lovd.nl/
[10] https://www.sanger.ac.uk/tool/decipher-mapping-the-clinical-genome/

- подтвердить использование номенклатуры HGVS[11] и определить сборку генома и ссылки на транскрипты, используемые для обозначения вариантов;

- определить уровень проверки данных на предмет аналитической точности и оценить показатели качества, предоставленные для оценки точности данных;

- определить источник и независимость наблюдений.

Вариантная оценка также включает поиск научной и медицинской литературы. Литературу, использующую более раннюю номенклатуру и классификацию или основанную на одном наблюдении, следует использовать с осторожностью. При выявлении индивидуумов и семей с вариантом, наряду с ассоциированными фенотипами, важно учитывать, как были выявлены пациенты. Следует учитывать, что информация о затронутых лицах может сообщаться несколько раз. Это может быть связано с совпадением авторства, межлабораторным сотрудничеством или наблюдением за пробандом и членами семьи в разных клинических системах. В результате возможен двойной подсчет пораженных пациентов и ложное увеличение частоты вариантов.

Клиническим лабораториям следует внедрить внутреннюю систему для отслеживания всех вариантов последовательностей, идентифицированных в каждом гене. Также им рекомендовано сотрудничать с клиницистами, чтобы лучше понять, как генотип влияет на клинический фенотип, и устранить разночтения в интерпретации вариантов в разных лабораториях.

[11] http://www.hgvs.org/mutnomen

2.3. Как понять заключение?

Заключение по результатам WGS оформляется в соответствии с международными и российскими рекомендациями.

К документам, на которые следует опираться при подготовке и интерпретации заключения, относятся:

- Sue Richards, Nazneen Aziz, Sherri Bale et al. //Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. // Genetics in medicine doi:10.1038/gim.2015.30
- ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing, Genetics in medicine, V. 15, Number 9, September 2013, p. 733-747
- College of American Pathologists' Laboratory Standards for Next-Generation Sequencing Clinical Tests, Arch Pathol Lab Med. 2015;139:481–493
- Guidelines for diagnostic next-generation sequencing, European Journal of Human Genetics (2016) 24, 2–5
- Use of Standards in FDA Regulatory Oversight of Next Generation Sequencing (NGS)-Based In Vitro Diagnostics (IVDs) Used for Diagnosing Germline Diseases, Document issued on July 8, 2016
- Keith Nykamp, Michael Anderson, Martin Powers et al. Sherloc: a comprehensive refinement of the ACMG–AMP variant classification criteria. Genet Med. 2017 Oct; 19(10): 1105–1117. doi: 10.1038/gim.2017.37
- Sarah S Kalia, Kathy Adelman, David T. Miller et al. Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2016 update (ACMG SF v2.0): a policy statement of

the American College of Medical Genetics and Genomics. Published 2017 in Genetics in Medicine, DOI:10.1038/gim.2016.190

- Ellard, Emma L Baple, Martina Owens et al. ACGS Best Practice Guidelines for Variant Classification 2017. The Association for Clinical Genomic ScienceSian
- Monkol Lek, Konrad J. Karczewski et al.// Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. // Nature volume 536, pages 285–291 (18 August 2016)
- Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б., Коновалов Ф.А., Масленников А.Б., Степанов В.А., Афанасьев А.А., Заклязьминская Е.В., Ребриков Д.В., Савостьянов К.В., Глотов А.С., Костарева А.А., Павлов А.Е., Голубенко М.В., Поляков А.В., Куцев С.И. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2). Медицинская генетика. 2019;18(2):3-23. https://doi.org/10.25557/2073-7998.2019.02.3-23

Как было указано выше, вместо термина «мутация» рекомендуется использовать термин «вариант нуклеотидной последовательности». «Вариант» может быть описан как патогенный (pathogenic), вероятно патогенный (likely pathogenic), неопределенного значения (uncertain significance), вероятно доброкачественный (likely benign), доброкачественный (benign).

Описание вариантов производится согласно ресурсу http://www.hgvs.org/mutnomen. Инструменты для обеспечения правильной номенклатуры описаны в https://mutalyzer.nl.

При упоминании баз данных и литературных источников, необходимо придерживаться правил, указанных в разделе 2.2.

Критерии классификации вариантов нуклеотидной последовательности:

1. Критерии патогенности: очень сильный (PVS1), сильный (PS1-4), средний (PM1-5), вспомогательный (PP1-5).

2. Критерии доброкачественности: очень сильный (независимый) (BA1), сильный (BS1-4), вспомогательный (BP1-6).

В отчете должна быть указана информация

- о пациенте,

- обнаруженных патогенных вариантах,

- о покрытии,

- интерпретации с доказательной базой,

- отчет по вариантам в генах неопределённого значения, показанных к тестированию

- методология.

Диагноз считается установленным, если в заключении указан патогенный или вероятно патогенный вариант, обнаруженный у пациента и ассоциированный с его фенотипом.

Если указана неопределенная значимость варианта, необходимо дополнительно проверять его, а именно провести сегрегационный или функциональный анализ. Таким образом, при назначении полногеномного секвенирования врач должен понимать, что в рамках данного исследования могут быть выявлены варианты неопределенной значимости. Несмотря на то, что большинство лабораторий, проводящих NGS-тестирование, предоставляют оценку патогенности варианта, к ней следует относиться с осторожностью. Многие из этих вариантов окажутся доброкачественными. Необходимо помнить, что любой редкий вариант потенциально может быть патогенным, в то время как инструменты биоинформатики могут оценивать его как доброкачественный вариант. Аналогично, вероятно патогенные варианты могут в дальнейшем оказаться доброкачественными. В любом случае для интерпретации результатов необходимым является сопоставление выявленных находок с фенотипическими проявлениями у

пациента. При возможности следует произвести секвенирование геномов пробанда и обоих родителей, о чем было сказано выше, поскольку это существенно повышает достоверность интерпертации любых обнаруженных вариантов.

Контрольные вопросы и задания:

1. Какие пять типов вариантов, которые могут быть описаны по результатам NGS в соответствии с рекомендациями ACMG?
2. Какие условия необходимо учитывать лабораториям, выполняюшим NGS, при использовании баз данных?
3. При каких условиях диагноз считается установленным по результатам NGS?
4. Что представляют собой варианты неопределенной значимости?
5. Как дополнительно проверить вариант неопределенной клинической значимости?
6. С чем необходимо сопоставлять находки непореденной значимости при генетическом тестировании?
7. Какие недостатки можно отметить при использовании баз данных?
8. Какая информация должна быть указана в отчете исследования?
9. Какие критерии классификации вариантов нуклеотидной последовательности вам известны?
10. На какие документы необходимо ориентироваться при подготовке и интерпретации результатов исследования?

ГЛАВА 3. КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ СЕКВЕНИРОВАНИЯ СЛЕДУЮЩЕГО ПОКОЛЕНИЯ В МЕДИЦИНЕ

3.1. Секвенирование нового поколения в неврологии

Прогресс в области молекулярной медицины привел к изменениям в изучении психоневрологических заболеваний. Современные технологии секвенирования послужили основой для понимания патогенетических механизмов различных неврологических расстройств, выделения новых нозологий, для разработки подходов к таргетному лечению.

Генетическое тестирование при заболеваниях нервной системы показано для установления диагноза и прогноза, генетического консультирования пациентов и их семей, пренатального тестирования и разработки новых терапевтических стратегий.

Среди неврологических и психиатрическх расстройств многие заболевания имеют моногенную этиологию, другие имеют полигенную или мультифакторную этиологию. Известно, что генетическая составляющая этой группы заболеваний включает и генные мутации, и однонуклеотидные варианты (SNV), а также хромосомные микроструктурные перестройки или вариации числа копий (CNV). Применение соответствующих генетических тестов зависит от клинического фенотипа, частоты заболевания, характера наследования предполагаемого заболевания, а также доступности тестов и их стоимости. Метод сравнительной геномной гибридизации (aCGH) помогает выявить хромосомные структурные вариации или CNVs, в значительной степени заменяя кариотипирование. Определенные нарушения (субтеломерные аномалии или микроделеции) могут быть выявлены с помощью флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) или мультиплексной лигандно-зависимой амплификации (MLPA). Основным методом для анализа одного гена является секвенирование по Сэнгеру.

В отличие от перечисленных методов секвенирование нового поколения (NGS) дает возможность одновременного секвенирования нескольких генов,

полных экзомов или геномов человека, являясь мощным инструментом в исследовании сложных наследственных нервно-психических расстройств. NGS помогает в идентификации патогенных вариантов и выявлении вариантов-кандидатов. Поскольку фенотипические проявления различных наследственных неврологических заболеваний нередко перекрываются, большинство из них могут быть четко диагностированы только с помощью панельного тестирования вариантов. Панели из нескольких генов, ответственных за определенный неврологический и психиатрический признак, применяются для выявления таких нарушений как эпилепсия, двигательные расстройства, нарушения интеллектуального развития, заболевания периферической нервной системы и др. Различные исследования показали, что для выявления каузативных мутаций, связанных с расстройствами нервной системы, могут быть успешно использованы секвенирование всего экзома (WES) и секвенирование всего генома (WGS). Очевидно, что в недалеком будущем WES и WGS будут иметь важные значения для повседневной клинической практики в неврологии.

Рассмотрим некоторые нарушения развития и заболевания нервной системы, для которых рекомендовано использование NGS технологий.

Врожденные пороки развития нервной системы

Врожденные пороки развития центральной нервной системы (ЦНС) представляют собой структурные аномалии, приводящие к нарушению функции головного и/или спинного мозга. В основе генетических причин пороков развития нервной системы лежат многочисленные генетические варианты, критически важные для нормального развития мозга и ответственные за различные нервно-психические дисфункции. Например, при таком врожденном пороке головного мозга, как лиссэнцефалия отмечается выраженная генетическая гетерогенность порока с разными типами наследования. Наследование может быть аутосомно-доминантным (гены *PAFAH1B1, TUBA1A, TUBB2B, TUBB*3), аутосомно-рецессивным (гены *VLDLR, RELN)* или Х-сцепленным (гены *DCX, ARX*).

Важную группу представляют пороки развития коры головного мозга**,** в клинической манифестации которой преобладают эпилепсия и когнитивные нарушения. Сообщается о более чем 100 генетических вариантах, ответственных за ВПР коры головного мозга. Большое количество генов-кандидатов для пороков развития коры головного мозга делает полноэкзомное или полногеномное секвенирование тестом выбора. С помощью экзомного секвенирования были выявлены новые гены-кандидаты, в частности. мутации в гене *WDR62*, ответственные за широкий спектр тяжелых ВПР мозга и мозжечковых аномалий, мутации в гене *DYNC1H1* могут быть связаны с вариабельными фенотипами, включая тяжелую задержку развития с различными нарушениями миграции нейронов и периферической нейропатией.

Большой интерес представляет собой группа заболеваний, называемых цилиопатиями, с первичной дисфункцией ресничек (неподвижные цилии - это субклеточные органеллы, играющие ключевую роль в эмбриональном развитии). В неврологии к цилиопатиям относятся синдромы Жубера и Меккеля-Грубера. Синдром Жубера, клинически и генетически гетерогенная группа заболеваний, характеризуется аплазией/гипоплазией червя мозжечка и другими пороками развития головного и спинного мозга. Характерным МРТ-признаком при этом заболевании является симптом «молярного зуба» - увеличенный четвертый желудочек. Клинические симптомы включают задержку развития, гипотонию, атаксию, глазодвигательные аномалии и нарушения дыхания (гипер-/гипопноэ). Синдром Меккеля-Грубера – аутосомно-рецессивный синдром, характеризующийся классической триадой клинических признаков: затылочное энцефалоцеле, поликистоз почек и фиброз печени.

Метод NGS произвел революцию в идентификации генов и геномной диагностике в области цилиопатий. Были выявлены мутации в более чем 100 генах цилиопатии, включая более 20 генов, имеющих отношение к неврологическим расстройствам с аутосомно-рецессивным или Х-

сцепленным наследованием. Группа генов, связанных с синдромами Жубера и Меккеля-Грубера, включает *AHI1, ARL13B, B9D1, B9D2, C5orf42, CC2D2A, CEP290, CEP41, CSPP1, INPP5E, KIF7, MKS1, NPHP1, NPHP3, PDE6D, OFD1, RPGRIP1L, TCTN1, TCTN2, TCTN3, TMEM67, TMEM138, TMEM216, TMEM231, TMEM237 и TTC21B.*

Эпилепсия

Эпилепсия определяется как поражение головного мозга, характеризующееся устойчивой предрасположенностью к судорогам. Считается, что генетические причины играют определенную роль по крайней мере у 70% больных эпилепсией. Наследственные эпилепсии можно разделить на моногенные эпилепсии (каналопатии, вызванные дефектами в генах, регулирующих ионные каналы) и эпилепсии, обычно не имеющие отягощенного семейного анамнеза по судорогам (нарушения функции возбуждающих или тормозных нейротрансмиттеров, вызванные взаимодействием нескольких генетических вариантов).

Наиболее частые формы эпилепсий с моногенным наследованием обусловлены мутациями:

- в генах калиевых каналов, таких как *KCNQ2* и *KCNQ3*, при доброкачественных семейных неонатальных судорогах;

- гена *PRRT2* (кодирующего трансмембранный белок и регулятор ионных каналов) при доброкачественной семейной неонатальной эпилепсии;

- генов *SCN1A, SCN2A* и *SCN1B* (кодирующих натриевые каналы, содержащие α- и β-субъединицы) при доброкачественных семейных неонатальных инфантильных судорогах.

Сложность диагностики состояний с эпилепсиями заключается в том, что различные мутации в одном и том же гене могут вызывать разные заболевания и наоборот мутации в разных генах вызывают схожие по фенотипическим проявлениям состояния.

Например, спектр клинических состояний, обусловленных мутациями в гене *SCN1A*, включает в себя разные заболевания:

- синдром Драве,

- семейные фебрильные судороги,

- генерализованную эпилепсию с фебрильными судорогами,

-семейную мигрень с гемипарезом во время приступов.

Эффективность использования метода NGS в таких случаях продемонстрирована в ряде работ. Например, Carvill и др. провели полноэкзомное секвенирование у пациентов с *SCN1A*-отрицательным синдромом Драве. Были обнаружены мутации, вызывающие заболевание, в двух новых для синдрома Драве генах - *GABRA1* и *STXBP1*. Также были выявлены три пациента с ранее не описанными мутациями гена *SCN1A*.

В таблице 1 представлены гены, связанные с некоторыми эпилептическими синдромами.

Таблица 1

Гены, связанные с отдельными эпилептическими синдромами	
Прогрессирующая миоклоническая эпилепсия	*SCARB2, PRICKLE2, KCTD7, COL6A2, CERS1, CERS2*
Доброкачественные семейные неонатальные судороги	*KCNQ3, KCNQ2, SCN2A*
Генерализованная эпилепсия в сочетании с фебрильными судорогами	*SCN1A, SCN1B, GABRD, GABRG2*
Синдром Драве	*SCN1A, SCN1B, GABRD, GABRG2, GABRA1*
Злокачественные мигрирующие парциальные припадки младенческого возраста	*TBC1D24, PLCB1, SCN1A, KCNT1*
Эпилептические энцефалопатии	*KCNQ2, SCN2A, CDKL5, KCTD7, ARHGEF9, CHD2, SYNGAP1, MBD5, STXBP1, SCN8A, ALG13, HNRNPU, GNAO1, SLC25A22, SLC35A3, IQSEC2, GRIN1, HDAC4, HCN1, GABRB3, TBC1D24*

Эпилепсия часто встречается и при наследственных болезнях обмена. В эту группу входят дефицит транспортера глюкозы 1 (ген *SLC2A1*), дефицит биотинидазы (*BTD*), нарушения метаболизма B6 (*ALDH7A1, PNPO*), дефицит серина (*PHGDH*) и нейродегенерация, вызванная дефицитом транспортера церебральных фолатов (*FOLR1*). Все эти гены должны быть исследованы при наличии эпилепсии, поскольку эти заболевания требуют точной диагностики и введения специфической терапии, чтобы избежать развития необратимого повреждения мозга.

Эпилепсия также часто встречается при редких синдромах с дизморфиями и нарушением развития. В таких случаях технологии NGS позволяют обнаружить специфические варианты, ответственные за синдромальные формы с сопутствующей эпилепсией. Так, например, успешное применение NGS технологий было продемонстрировано для обнаружения причины аутосомно-доминантного заболевания - синдрома Кабуки (OMIM 147920). Ng с соавт. при проведении массивного параллельного секвенирования геномов у 10 неродственных пробандов с синдромом Кабуки обнаружили мутации в гене *MLL2,* что убедительно свидетельствовало о том, что выявленные изменения являются основной причиной синдрома Кабуки.

В таблице 2 представлены гены, связанные с эпилепсиями, обусловленными метаболическими нарушениями и структурными аномалиями мозга.

Таблица 2

Гены, связанные с отдельными редкими метаболическими и структурными эпилепсиями	
Пиридоксин-зависимая эпилепсия	*ALDH7A1*
Пиридоксаль 5'-фосфат-зависимая эпилепсия	*PNPO*

Синдром дефицита транспортера глюкозы типа I	*SLC2A1*
Глициновая энцефалопатия	*AMT, GCSH, GLDC*
Синдромы дефицита креатина	*GAMT, GATM*
Дефицит аденилосукцинатлиазы	*ADSL*
Нарушения, связанные с POLG (например, синдром Альпера-Хуттенлохнерса)	*POLG*
Инфантильный нейрональный цероидный липофусциноз 1, поздний инфантильный нейрональный цероидный липофусциноз	*PPT1, TPP1*
Туберозный склероз	*TSC1, TSC2*
Синдром Ретта	*MECP2*
Врожденные пороки мозга	*ACTB, ACTG1, AHI1, ARFGEF2, ARX, CASK, CC2D2A, CEP290, CEP41, CHMP1A, DCX, EOMES, EXOSC3, FKRP, FKTN, FLNA* и др.

Таким образом, для эпилепсии в целом характерна выраженная гетерогенность, что затрудняет выбор подходящего гена для секвенирования и определяет современные технологии массового параллельного секвенирования как наиболее эффективные методы диагностики этих заболеваний.

Нейромышечные заболевания

Нейромышечные заболевания (НМЗ) - это гетерогенная группа заболеваний, вызванных повреждением или нарушением работы периферической нервной системы: клеток передних рогов спинного мозга, периферического нерва, нервно-мышечного соединения или скелетной

мышцы. Большинство НМЗ являются наследственными заболеваниями. Они передаются как аутосомно-доминантные, аутосомно-рецессивные или Х-сцепленные признаки; мутации митохондриальной ДНК также ответственны за некоторые заболевания этой группы. НМЗ проявляются широким спектром симптомов, часто наблюдается значительная меж- и внутрисемейная вариабельность. НМЗ соответствуют эпидемиологическим критериям редких заболеваний. Некоторые из них встречаются крайне редко и описаны в единичных семьях по всему миру. Редкость НМЗ, высокая частота мутаций de novo и отсутствие определенных биологических маркеров многих НМЗ делают диагностику этой группы заболеваний сложной.

Только при некоторых наследственных НМЗ клинический и генетический диагноз не вызывает затруднений. Клиническая картина и результаты достаточно простых диагностических тестов, таких как сывороточная креатинкиназа, электромиография (ЭМГ) или исследование нервной проводимости достаточны для того, чтобы направить пациента на целевое генетическое тестирование, например, для выявления мышечной дистрофии Дюшенна/Беккера (OMIM 310200), проксимальной спинальной мышечной атрофии 5q (OMIM 253300, 253550, 253400, 271150), миотонической дистрофии 1 и 2 типа (DOMIM160900, OMIM 602668) или наиболее частой наследственной невропатии Шарко-Мари-Тута 1А (OMIM 118220). При спинальной мышечной атрофии и миодистрофии Дюшенна сразу после клинического обследования первым шагом диагностического алгоритма является генетическое тестирование. ЭМГ и биопсия мышц больше не требуются этим пациентам до генетического тестирования. Такой подход не может быть использован для большинства пациентов с НМЗ, когда с данным фенотипом связана высокая генетическая гетерогенность.

Из-за отсутствия информативных генетических результатов у многих пациентов с врожденными миопатиями, мышечными дистрофиями или нейропатиями затруднено генетическое консультирование. Только молекулярная диагностика может помочь в дифференциации некоторых

хорошо поддающихся лечению наследственных врожденных миастенических синдромов от врожденных миопатий. По состоянию на сегодняшний день, мутации в более чем 200 генах ядерного генома были отнесены к различным НМЗ.

В настоящее время используется несколько подходов к генетической диагностике НМЗ. Все они основаны на клиническом диагнозе в сочетании с эпидемиологическими данными или выявлении основных мутаций, преобладающих в данной популяции. Они варьируют от скрининга мутаций отдельных генов по методу Сэнгера до тестирования панелей генов, предназначенных для подгрупп НМЗ.

Полногеномное и полноэкзомное секвенирование зарекомендовали себя как мощные методы идентификации генов, вызывающих различные наследственные заболевания. WGS и WES представляются очень хорошими инструментами для исследования НМЗ, учитывая их сложность. Интерпретация результатов NGS может быть простой, если выявлена ранее описанная мутация, связанная с определенным фенотипом. В большинстве случаев NGS выявляет большое количество вариантов по сравнению с референсной последовательностью; некоторые из них будут иметь неизвестное значение. NGS позволила идентифицировать ряд новых генов НМЗ. Однако новые, потенциально патогенные мутации нуждаются в подтверждении путем сегрегационного анализа или функциональных исследований. В этой связи NGS пока нельзя рассматривать как рутинный метод диагностики НМЗ, и клиницисты должны понимать его текущие ограничения. Тем не менее следует отметить, что полногеномное и полноэкзомное секвенирование представляет собой привлекательный вариант для генетической диагностики многих редких НМЗ, причем в настоящее время успешность подтверждения каузативных мутаций приближается к 25%. Исследования с помощью NGS могут привести к лучшему пониманию патофизиологии НМЗ или улучшить подход к фармакотерапии.

Умственная отсталость

Умственная отсталость (УО) определяется как значительное нарушение интеллектуального развития; ограничение адаптивного поведения, такого как социальные и практические навыки; и начало заболевания в возрасте до 18 лет. УО представляет собой континуум нарушений интеллектуального развития и делится на несколько степеней тяжести. Оценки частоты УО различаются в зависимости от исследования и тяжести симптомов, но в среднем составляют от 0,3 до 0,5% для тяжелых форм и до 7-8% для легких форм. У пациентов с более легкой степенью тяжести УО, чей IQ составляет около 70 вероятность найти генетическую причину их нарушения оценивается примерно в 30% из-за мультифакториальной природы УО легкой и средней степеней тяжести. С другой стороны, тяжелые формы УО (IQ ниже 35) в большинстве случаев представлены хромосомными или моногенными заболеваниями, поэтому вероятность выявить этиологические факторы в этой группе гораздо выше. Очевидно, что выявление генетических причин УО позволяет проводить адекватное генетическое консультирование с оценкой повторного риска и возможностью пренатальной диагностики, а также оптимизацию лечения и предупреждения возможных осложнений. Это также позволяет сократить «диагностическую одиссею», сэкономить силы и время лечащих врачей.

УО, как известно, может иметь разные причины. С появлением и развитием лабораторных методов диагностики уровень установления причин УО значительно повысился. До 16% всех причин УО составляют видимые микроскопически хромосомные изменения. Внедрение различных методов субмикроскопического анализа, таких как FISH, MLPA или aCGH, еще более повысило уровень выявления причин УО. По современным данным, еще 12% патогенных CNV выявляются на субмикроскопическом уровне с помощью метода aCGH. Моногенные Х-сцепленные формы УО (порядка 80 генов) относительно легко выявляются, но другие моногенные дефекты диагностируются с разной эффективностью, что отражает гетерогенную природу интеллектуальных нарушений. Суммарно при использовании всех

вышеперечисленных методов при УО уровень выявления причин до появления NGS оценивался примерно в 40%.

Технология NGS как диагностический инструмент в выявлении причин УО начал использоваться с начала 2000-х годов. Причем алгоритмы выявления причин были разными. Подход «от фенотипа к генотипу» применялся для синдромальных форм УО с клинически дифференцируемым фенотипом, т.е. в таких случаях фенотип должен стать убедительным доказательством в пользу определенного диагноза. С помощью такого подхода были выявлены причинные мутации таких синдромов как синдромы Шинцеля-Гидиона, Кабуки и Миллера, а также генетически гетерогенных синдромов Нунан и Каллмана. Подход «от генотипа к фенотипу» эффективен в случаях, когда после применения WES/WGS были установлены причины заболеваний, которые первоначально не могли быть распознаны клинически.

Применение WGS оправдано для случаев УО, не имеющих других сопутствующих признаков, так называемой несиндромальной или неспецифической УО. В этой группе УО фенотип неинформативен и не дает «подсказок» по предположению возможных причин.

В работе Gilissen с соавт. каузативные мутации с помощью WGS были обнаружены у 21 из 50 пациентов с IQ менее 50. В их число вошли 20 вариантов de novo в известных генах или генах-кандидатах и один вариант с компаунд-гетерозиготой. Важно отметить, что группа для WGS исследования была отобрана после применения ХМА и WES с диагностической эффективностью 12 и 27% соответственно. Окончательная оценка эффективности WGS в получении генетического диагноза составила около 60%.

УО является чрезвычайно гетерогенным симптомом (а далеко не всегда заболеванием как таковым). В большинстве случаев, когда специфический синдром не распознается на клиническом уровне, в качестве первого диагностического шага применяется ХМА, за которым следует WES, а затем WGS. Новые методы анализа данных позволяют также с помощью WES/WGS

выявлять CNVs. Однако, чем чувствительнее тест, тем больше проблем возникает при интерпретации результатов. Использование WGS, который теоретически должен быть более мощным диагностическим инструментом, чем WES, в настоящее время ограничено непониманием роли вариаций в некодирующей части генома.

Некоторые нетипичные синдромальные проявления, выявленные с помощью WES/WGS, расширяют клинические знания, но также требуют значительных корректировок в процессе генетического консультирования. Другой проблемой является интерпретация мутаций de novo против унаследованных мутаций. И, наконец, может быть выявлено несколько изменений, отвечающих определению полигенной модели, особенно при неспецифических фенотипах УО.

Аутизм

Согласно современной классификации вместо аутистического расстройства введена категория под названием «расстройства аутистического спектра» (РАС), заменяющая синдром Аспергера, детское дезинтегративное расстройство и персистирующее расстройство развития. РАС характеризуется стереотипными моделями поведения и нарушениями социальных взаимодействий и коммуникативных способностей. Распространенность РАС в общей популяции составляет около 1%.

Хотя РАС является сложным гетерогенным заболеванием, в развитии заболевания участвует генетическая компонента, для выявления которой и проводится генетическое тестирование. В настоящее время стандартом генетического тестирования для диагностики РАС является ХМА, однако секвенирование всего генома имеет ряд ключевых преимуществ и, вероятно, в ближайшем будущем заменит микрочипы в качестве основного генетического теста.

К настоящему времени известно, что с в части случаев аутизма причиной являются уникальные хромосомные перестройки (CNVs), выявленные с помощью ХМА.

Ожидается, что технологии NGS позволят выявить как редкие, так и распространенные однонуклеотидные варианты (SNV), которые встречаются в более чем 70% случаев аутизма, патогенез которого в настоящее время неизвестен.

Однако выявление только SNVs/CNVs - это только начало процесса раскрытия причинно-следственной связи РАС. Есть надежда, что со временем современные методы позволят установить связи на белковом уровне между продуктами генов, признанных патогенными.

Алгоритм диагностики умственной отсталости и аутизма

В процессе клинической диагностики аутичного ребенка или ребенка с УО необходимо учитывать все фенотипические особенности, встречающиеся у одного пациента, включая аутичные черты, УО или эпилепсию, а также другие физические характеристики, например, дизморфии, пороки развития, а также семейный анамнез.

Сочетание дизморфических признаков, встречающихся у детей с задержкой психомоторного развития и/или УО, должно помочь установить клинический диагноз и отобрать тех пациентов, для которых вероятность установления генетической причины заболевания с помощью доступных генетических методов, включая ХМА и NGS, наиболее высока.

Клинически полезно выделять аутизм/УО без других сопутствующих признаков (аутизм/УО) и аутизм/УО с другими клиническими симптомами (аутизм/УО+). Особенно высокая вероятность выявления генетического дефекта, до 25%, относится к последней подгруппе. На рисунке 1 представлена диагностическая схема для фенотипов УО и/или аутизма. Как показано на рис. 6, в зависимости от фенотипа, семейного анамнеза и финансовых возможностей можно сделать различный выбор. Однако необходимо отметить, что, согласно последним данным, около трети случаев остаются недиагностированными даже после применения панелей, WES и WGS.

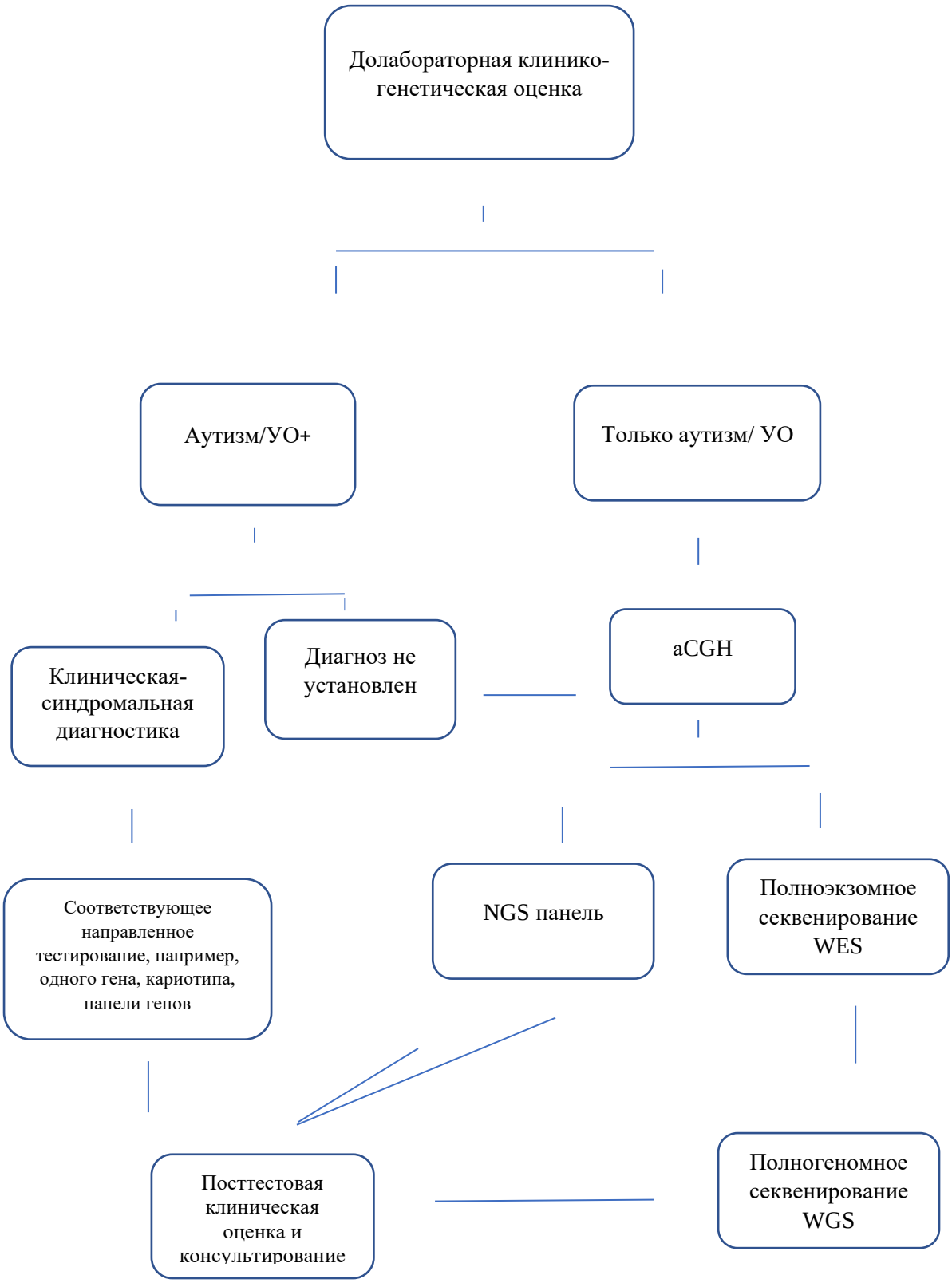


Рис.6. Диагностическая схема для УО и/или аутизма

Наследственные нарушения обмена веществ

Наследственные нарушения обмена веществ обычно сопровождаются неврологическими симптомами. Диагностика нейрометаболических заболеваний часто затруднена из-за их сложных фенотипов. Для диагностики этих заболеваний пациенту проводится комплексное обследование, включающее клинические, биохимические и инструментальные исследования. Однако в сложных случаях именно генетическое тестирование обеспечивает окончательное подтверждение клинических подозрений или является важным дополнением к предыдущим обследованиям, проведенным для постановки клинического диагноза.

Основные категории метаболических нарушений включают нарушения обмена аминокислот и органических кислот, лизосомные и пероксисомные нарушения, митохондриальные заболевания, а также нарушения нейротрансмиссии.

Лизосомные болезни накопления (ЛБН) - это группа из более 50 врожденных ошибок метаболизма, характеризующихся накоплением специфических субстратов в результате мутаций в генах, кодирующих лизосомальные ферменты. У абсолютного большинства больных наблюдаются неврологические симптомы. Ранняя диагностика имеет большое значение, поскольку существует специфическая терапия для некоторых ЛБН. При этом диагностика может быть затруднена из-за вариабельности и перекрываемости симптомов, особенно при поздних ювенильных и взрослых формах. Даже если диагноз подтверждается на основе современных биохимических анализов, необходимо также провести генетическое тестирование, чтобы проконсультировать семью и оказать адекватную помощь. В работе Fernández-Marmiesseet и др. NGS-тестирование было проведено в группе из 84 пациентов с нейродегенеративными заболеваниями с ранним началом, включая 18 пациентов с ранее идентифицированными мутациями и 66 неклассифицированных пациентов. В первой группе все ранее известные мутации были обнаружены с помощью NGS. В другой группе

генетический диагноз ЛБН был поставлен у 26 пациентов. Проведенное исследование подтвердило эффективность NGS в диагностическом исследовании нейрометаболических нарушений. Еще одним преимуществом NGS была способность выявлять крупные делеции и инсерции (макроделеции были обнаружены в двух генах).

Митохондриальные заболевания могут быть вызваны мутациями как в ядерных (около 1200 генов), так и в митохондриальных генах (37 генов) с материнским типом наследования. В этом случае при диагностике и дифференциальной диагностике выбор подходящего гена для секвенирования по Сэнгеру затруднителен. Nishri et al. описали пациента, у которого по клиническим данным и результатам МРТ подозревался синдром, похожий на синдром Ли; однако секвенирование экзома выявило гетерозиготную мутацию в гене *GFAP*, являющуюся причиной синдрома Alexander. Кроме того, Fraser et al. описали братьев и сестер с болезнью, похожей на синдром Ли. Проведенные лабораторные исследования были безрезультатными; только анализ органических кислот мочи показал повышение молочной, альфа-кетоглутаровой и фумаровой кислот, а в результате WES была выявлена мутация гена тиаминпирофосфокиназы в гомозиготном состоянии. Поскольку пирофосфат тиамина является кофактором во многих ферментативных реакциях, включая митохондриальные ферменты, его недостаток вызывает прогрессирующую энцефалопатию, которую можно предотвратить ранним введением кофактора. Этот пример наглядно иллюстрирует важность применения метода NGS как надежного диагностического инструмента в нерешенных случаях.

3.2. Секвенирование нового поколения в кардиологии

В происхождении многих заболеваний сердечно-сосудистой системы значительную роль играют генетические факторы, что определяет высокую потребность генетического консультирования при этих заболеваниях. К ним относятся в первую очередь кардиомиопатии, первичные аритмии, аневризма и расслоение грудной аорты, семейная гиперхолестеринемия и врожденные пороки сердца. Результаты генетического исследования могут также повлиять на проведение адаптационно-защитных мер образа жизни или терапии. Определение наследственной основы заболевания обычно предполагает более раннее начало и худший прогноз.

Важным аспектом наследственных болезней сердца является то, что их границы часто размыты, фенотипы перекрываются, сосуществуют у одного и того же человека или встречаются в одной семье в виде различных проявлений, обусловленных общим генетическим дефектом. Аритмия может развиваться вторично по отношению к кардиомиопатии и наоборот. При некоторых системных заболеваниях кардиомиопатии сочетаются с врожденными пороками сердца, а аневризма грудной аорты может сопутствовать двустворчатому аортальному клапану. Сердечно-сосудистые заболевания весьма гетерогенны, и существует более 100 генов, непосредственно участвующих в патогенезе различных клинических форм. Например, гены саркомеров, вовлеченные в несколько видов кардиомиопатии, а также ишемической болезни сердца, и мутации в гене *SCN5A*, известные как вызывающие аритмии, как сообщалось, приводят к дилатационной кардиомиопатии. Помимо строго моногенного доминантного наследования, значительная часть случаев обусловлена одним или несколькими генетическими дефектами, расположенными в одном или разных генах, что часто связано с тяжелым фенотипом. Кроме того, частые полиморфизмы могут модифицировать проявления моногенных заболеваний, что приводит к ухудшению прогноза. Учитывая отмеченную выше генетическую сложность,

молекулярная диагностика требует комплексного подхода с параллельным анализом большого количества генов.

Хотя молекулярно-генетическое тестирование раньше было преимущественно исследовательским инструментом, теперь оно вошло в клиническую практику из-за его высокого потенциала в обеспечении более индивидуального и информативного консультирования в семьях.

Информация по мутациям большинства известных генов, связанных с наследственными заболеваниями сердца, находится на сайтах Европейской базы данных по редким заболеваниям и орфанным препаратам (www.orpha.net) и Gene Tests (www.genetests.org).

Генетическое тестирование на наследственные заболевания сердца лучше всего рассматривать как семейный тест, а не как индивидуальный тест, поскольку результаты наиболее точно интерпретируются после объединения генетических и других исследований нескольких членов семьи. Общий подход к выявлению генетических причин семейного нарушения включает применение мультигенного панельного тестирования. Выявление вероятно или условно патогенных вариантов с последующей положительной верификацией с помощью сегрегационного анализа означает, что подтвержденное наличие мутации у члена семьи является основанием для применения терапевтических вмешательств. Отсутствие мутации приводит к отказу от дальнейших рутинных обследований. Несмотря на постоянный рост знаний о причинах наследственных сердечных заболеваний, эффективность генетического тестирования в зависимости от заболевания колеблется от 20 до 75%, и важно иметь в виду, что отрицательный генетический тест не исключает предполагаемый диагноз. В случае отрицательного генетического теста для пациента с четким клиническим фенотипом, рекомендуется проведение WES или WGS.

Важным аспектом применения секвенирования нового поколения в кардиологии являются случайные находки, выявленные при выполнении обширных анализов, таких как полноэкзомное или полногеномное

секвенирование у лиц, обследованных по причинам, не связанным с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

В этом разделе представлены некоторые современные сведения о генетике кардиомиопатий, аритмий, аневризмы и расслоения грудной аорты, семейной гиперхолестеринемии и врожденных пороков сердца.

Кардиомиопатии

Кардиомиопатия - это поражение миокарда, при котором сердечная мышца структурно и функционально аномальна, при отсутствии ишемической болезни сердца, гипертензии, клапанного порока или врожденного порока сердца, достаточного для того, чтобы вызвать наблюдаемую аномалию миокарда.

По структурно-функциональным изменениям сердца большинство кардиомиопатий классифицируют следующим образом: гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП), дилатационная кардиомиопатия (ДКМП), рестрикционная кардиомиопатия (РКМП), аритмогенная правожелудочковая кардиомиопатия (АПЖК)/аритмогенная желудочковая кардиомиопатия и неклассифицированные кардиомиопатии, в том числе левожелудочковая недостаточность. Помимо классификации по клиническим фенотипам заболевания сердца делят на десмосомопатии, цитоскелетопатии, саркомиопатии и каналопатии.

С момента идентификации первой вызывающей болезнь мутации в гене тяжелой цепи миозина *MYH7* в 1990 г. был достигнут огромный прогресс в раскрытии генетической основы наследственных кардиомиопатий, доказывающий, что они являются высоко гетерогенными заболеваниями, вызванными множеством генов, участвующих в генерации, передаче, регуляции сократительной силы сердечной мышцы, ее электрической активности и энергообеспечении. Применение методов NGS позволило открыть ряд новых генов, связанных с кардиомиопатией. Например, при проведении геномного секвенирования были идентифицированы мутации в генах *MRPL3, AARS2* как причины митохондриальных кардиомиопатий.

В настоящее время технологии NGS прочно вошли в клиническую диагностику кардиомиопатий. У пациентов с кардиомиопатией параллельное секвенирование является особенно привлекательным, так как у многих пациентов может быть более одного каузативного варианта, либо в одном и том же гене (компаунд-гетерозиготы), либо в разных генах (двойные гетерозиготы). Такие случаи могут составлять до 5% случаев всех ГКМП.

Идентификация усеченной мутации в гене *TTN* как ведущей причины дилятационной кардиомиопатии является ярким примером влияния NGS на выявление генетических причин кардиомиопатий. Ген *TTN* кодирует саркомерный белок титин. У 203 человек с ДКМП при применении секвенирования следующего поколения у 54 человек были выявлены мутации в гене *TTN*. Показано, что усеченные мутации *TTN* являются частой причиной дилатационной кардиомиопатии, встречаясь примерно в 25% семейных случаев идиопатической дилатационной кардиомиопатии и в 18% спорадических случаев. Включение секвенирования, которые обнаруживают мутации *TTN*, в генетическое тестирование дилатационной кардиомиопатии, должно существенно повысить уровень диагностики и своевременного терапевтического вмешательства. В другом крупном NGS исследовании, включавшем 223 неродственных пациента с гипертрофической кардиомиопатией анализировались кодирующие, интронные и регуляторные области 41 гена, вовлеченных в патогенез ГКМП и ДКМП. Основное внимание уделялось генам саркомерных белков. У 64% пациентов были выявлены потенциально каузативные варианты этих генов, не включая ген *TTN*. В четырех саркомерных генах (*MYH7, MYBPC3, TNNI3, TNNT2*) в значительном преимуществе по сравнению с контролем выявлены редкие несинонимичные SNV.

Согласно заявлению Рабочей группы Европейской ассоциации кардиологов о генетическом консультировании и тестировании при кардиомиопатиях, причины для проведения генетического тестирования включают диагностику, оценку прогноза и принятие решений по лечению.

Проведение генетического тестирования целесообразно в следующих ситуациях:

1. Диагностика редких форм кардиомиопатии, особенно при наличии атипичных фенотипических признаков.

2. Оценка прогноза заболевания у ближайших родственников.

3. Предиктивная диагностика у детей.

Гипертрофическая кардиомиопатия

Гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМ) – наиболее частое наследственное заболевание сердца, встречающееся у 1 из 500 человек. ГКМ характеризуется увеличенной толщиной стенки желудочков при отсутствии нагрузки (пороки клапанов, гипертония), способствующей развитию наблюдаемых изменений. Изолированная семейная ГКМ наследуется как аутосомно-доминантный признак с неполной пенетрантностью. Фенотипические проявления могут варьировать от бессимптомного течения до предсердных и желудочковых аритмий и сердечной недостаточности. ГКМ часто называют «болезнью саркомера», и, соответственно, более 1000 выявленных на сегодняшний день мутаций находятся в генах, ответственных за структуру и функционирование саркомера. Дефект, вызывающий заболевание, обнаруживается примерно у 50-60% пациентов с отягощенным семейным анамнезом по ГКМ и у 20-30% без отягощения. Основными причинами ГКМ являются мутации в *MYH7* (В-миозиновая тяжелая цепь) и *MYBPC3* (миозин-связывающий протеин С), которые в совокупности ответственны примерно за 80% случаев. *TNNT2* (тропонин Т) и *TNNI3* (тропонин I) объясняют 5% случаев, в то время как *TPM1* (тропомиозин 1) вызывает около 2%, а *MYL3* (легкая цепь миозина 3) - 1% случаев. Некоторые варианты *MYH7* считаются особенно злокачественными (например, R403Q, R453C, G716R и R719W) и несколько мутаций в *TNNT2* ассоциируются с высокой частотой внезапной смерти в раннем возрасте, а варианты *MYBPC3* связаны с более поздним началом заболевания. На фенотипические проявления ГКМ могут влиять частые полиморфизмы. В то же время

пациенты с отрицательными результатами генетических тестов чаще имеют более мягкий фенотип. Таким образом, тестирование важно не только для диагностики заболевания, но и прогноза его течения.

Дилатационная кардиомиопатия

Дилатационная кардиомиопатия (ДКМ) характеризуется расширением и систолической дисфункцией левого желудочка при отсутствии повышенной нагрузки (гипертония, поражение клапанов) или заболеваний коронарных артерий. Расширение и дисфункция правого желудочка может присутствовать, но не являются обязательными для постановки диагноза. До 30% случаев ДКМ имеют наследственное происхождение, в основном с аутосомно-доминантным типом наследования. Заболевание генетически гетерогенное, известно более 30 генов, ответственных за развитие заболевания. Наиболее часто выявляемые причинные мутации находятся в генах *TTN, LMNA, MYH7* и *TNNT2*. По разным оценкам уровень выявления генетической причины ДКМ составляет 30-35%. Генетическое тестирование при ДКМ имеет не только диагностическое, но и прогностическое значение. Например, у лиц с мутациями в генах *LMNA* и *DES* высок риск внезапной сердечной смерти. Еще одно наблюдение касается того, что возраст появления симптомов заболевания варьирует в зависимости от дефектного гена. Варианты *LMNA* чаще проявляются во взрослом возрасте, варианты *DSP* характерны только для взрослых, в то время как варианты *RBM20* были представлены в группе детей. Кроме того, ДКМ наблюдается при некоторых наследственных синдромах (синдромальные формы ДКМ), таких как синдром Альстрёма, мышечная дистрофия Дюшенна или синдром Кернса-Сейра. Генетическая гетерогенность и разнообразие фенотипических проявлений являются показанием для применения методов массового параллельного секвенирования.

Аритмогенная дисплазия правого желудочка

Аритмогенная дисплазия правого желудочка (АДПЖ) – редкое наследственное заболевание сердечной мышцы, являющееся одной из основных причин внезапной смерти молодых людей. Клинический диагноз

заболевания может быть поставлен на основании выявления функциональных и структурных изменений правого желудочка. При этом заболевании происходит замещение миокарда жировой и фиброзной тканью. Нередко поражается и левый желудочек, что позволяет рассматривать это заболевание как аритмогенную кардиомиопатию. Более чем в 50% случаев АДПЖ носит семейный характер с аутосомно-доминантным наследованием с неполной пенетрантностью и варьирующей экспрессивностью. К настоящему времени идентифицирован ряд генов, связанных с АДПЖ. Часть из них ответственны за организацию и функционирование десмосомы (гены *DSP, PKP2, DSG2, DSC2* и *JUP)*, но описаны и другие гены (*TGFB3, RYR2* и *TMEM43*). Известны синдромальные формы с аутосомно-рецессивным типом наследования (синдромы Караваджа, Наксоса). Обширная дисплазия правого желудочка представляет собой так называемую аномалию Уля или «пергаментный правый желудочек», характеризующуюся устойчивой желудочковой тахикардией с блокадой левой ножки пучка Гиса. Хотя данные по генотип-фенотипические ассоциациям при этом заболевании немногочисленны, имеются сведения о связи мутаций в гене *DSP* с большей вероятностью поражения левого желудочка, а при мутациях в гене *TMEM43* повышенный уровень летальности у мужчин, чем у женщин. Таким образом, целесообразность проведения генетического тестирования целесообразно в связи с генетической гетерогенностью заболевания, а также прогностической целью.

Некомпактность (несокращение) левого желудочка

Некомпактность левого желудочка (НЛЖ) – форма наследственной кардиомиопатии, которая характеризуется многочисленными выраженными трабекулами и глубокими межтрабекулярными углублениями в гипертрофированных сегментах левого желудочка. Неуплотненный желудочковый миокард иногда называют губчатым миокардом.

Почти у всех пациентов с НЛЖ наблюдаются другие сердечные аномалии, включая врожденные пороки сердца, ГКМ, ДКМ. Эти сердечные

нарушения могут встречаться в одних и тех же семьях, что указывает вероятно на общность их генетических причин. В этой связи неудивительно, что НЖЛ имеет ту же генетическую основу, что и другие, кардиомиопатии, будучи обусловленными мутациями в саркомерных генах (*MYH7, ACTC1, TNNT2, MYBPC3* и *TPM1*). НЛЖ может быть также признаком синдромальных состояний, таких как синдромы Нунан и Барта, митохондриальная миопатия.

Данные по полногеномному секвенированию этой аномалии пока отсутствуют, но известно, что при исследовании аномалии с помощью генных панелей каузативные варианты удается выявить в 17-41% случаев. Помимо дефектов в саркомерных генах, мутации были обнаружены *CASQ2, CALR3, LMNA, LDB3* и *TAZ.*

Аритмии

Наследственные аритмии часто называют каналопатиями, поскольку лежащие в их основе генетические дефекты затрагивают субъединицы каналов или регулирующие белки. Основной целью генетического тестирования является выявление каузативных мутаций для ранней диагностики заболевания у пробанда и родственников, имеющих риск развития часто фатальных состояний, поэтому, независимо от рекомендаций относительно необходимости генетического тестирования указанных пациентов, после установления генетической причины заболевания эксперты всегда рекомендуют проводить мутационно-специфическое тестирование членов семьи. Когда человек умирает внезапно без видимых причин, с неясными результатами вскрытия и отрицательными токсикологическими тестами, смерть классифицируется как синдром внезапной смерти. Термин «генетическая аутопсия» применяется к генетическому тестированию образцов, полученных после смерти, для диагностики причины смерти. Ионные каналопатии вносят существенный вклад в структуру причин внезапной смерти при сердечных аритмиях. Наиболее частыми причинами её являются катехоламинергическая полиморфная желудочковая тахикардия (20% всех случаев), синдром удлиненного интервала QT (15%) и синдром

Бругада (<1%). Подобно кардиомиопатиям существует значительное перекрывание генов, связанных с разными «аритмическими» фенотипами, поскольку различные мутации в одном гене могут вызывать различные состояния.

Синдром удлиненного интервала QT

Наследственный синдром удлиненного интервала QT - это нарушение реполяризации, характеризующееся удлинением интервала QT, которое может привести к синкопальным эпизодам, потенциально летальным тахиаритмиям и внезапной сердечной смерти в молодом возрасте. В настоящее время известно 16 генов, связанных с синдромом удлиненного интервала QT - *KCNQ1, KCNH2, SCN5A, ANK2, KCNE1, KNCE2, KCNJ2, CACNA1C, CAV3, SCN4B, AKAP9, SNTA, KCNJ5, CALM1, CALM2, CALM3,* и соответственно выделено 16 типов синдрома (OMIM). Мутации с потерей функции в генах *KCNQ1* и *KCNH2* ответственны примерно за 70% случаев удлиненного интервала QT, и еще 5-10% связаны с вариантом с потерей функции в *SCN5A*. В совокупности эти три гена составляют до 80% случаев удлиненного QT, а остальные 10 генов - еще 5%.

Все изолированные формы имеют аутосомно-доминантное наследование. Помимо изолированных форм, выделены два синдрома с удлиненным интервалом QT. Заболевание, обусловленное мутациями в гене *KCNJ2,* называется синдромом Андерсена-Тавила, который характеризуется не только аритмиями, но и дизморфическими чертами лица, аномалиями скелета, периодическими параличами. Генетические варианты *CACNA1C* вызывают синдром Тимоти, характеризующийся полиорганными нарушениями, кожной синдактилией, неврологическими нарушениями, а также расстройствами аутистического спектра. Тип наследования этих синдромов аутосомно-доминантный. Мутации в генах *KCNQ1* и *KCNE1* приводят к развитию редкого аутосомно-рецессивного синдрома Джервелла и Ланге-Нильсена, при котором удлиненный QT сочетается с нейросенсорной глухотой, аритмиями, и высоким риском внезапной смерти.

Хотя в настоящее время часто диагностика ограничивается секвенированием трех генов (*KCNQ1, KCNH2, SCN5A*), расширение генетического тестирования с применением полногеномного секвенирования повысит его результативность.

Синдром Бругада

Синдром Бругада (СБ) - аутосомно-доминантное наследственное заболевание, характеризующееся задержкой проводимости и предрасположенностью к желудочковой тахикардии, приводящей к фибрилляции желудочков и вызывающей внезапную (часто ночную) сердечную смерть. Заболевание распознается по характерному подъему сегмента ST в правых прекардиальных отведениях электрокардиограммы. СБ является основной причиной синдрома внезапной необъяснимой смерти. В настоящее время, согласно OMIM, выделено 9 типов СБ с соответствующими каузативными генами. Среди выявленных случаев ведущей причиной заболевания являются мутации в гене *SCN5A* (75%). Основная ценность генетического тестирования заключается в подтверждении диагноза больным пациптам, а также в выявлении бессимптомных родственников пробанда, унаследовавших мутацию, что позволяет проводить среди них соответствующие профилактические мероприятия.

Катехоламинергическая полиморфная желудочковая тахикардия

Катехоламинергическая полиморфная желудочковая тахикардия (КПЖТ) - это наследственное генетически гетерогенное заболевание, характеризующееся тахикардией и желудочковой аритмией, индуцированной физической нагрузкой или эмоциональным перенапряжением. Для заболевания характерны повторяющиеся обмороки, судороги и внезапная смерть у молодых людей после физической активности или эмоционального стресса. Как правило, клинические кардиологические исследования, такие как ЭКГ и ЭхоКГ, не выявляют каких-либо изменений, также и при проведении патологоанатомических исследований не были выявлены структурные изменения сердца. Основной причиной КПЖТ являются мутации в гене

рианодинового рецептора (*RYR2*). Наследуется аутосомно-доминантным путем. В 3-5% случаев заболевание обусловлено мутациями в гене *CASQ2* с аутосомно-рецессивным типом наследования. Описаны и другие генетические формы КПЖТ. Каузативные мутации выявляются примерно в 65% случаев. Учитывая ранний возраст манифестации (средний возраст начала заболевания - 8 лет), ранняя генетическая диагностика КПЖТ важна для всех членов семьи пробанда, даже для тех, у кого нет никаких клинических симптомов, поскольку внезапная смерть может быть первым проявлением заболевания. Поскольку КПЖТ ассоциируется с синдромом внезапной детской смерти, тестирование также может проводиться при рождении ребенка для раннего начала профилактической терапии. Учитывая большой размер гена *RYR2*, генетическую гетерогенность и тот факт, что своевременное генетическое тестирование имеет большое значение в случае КПЖТ, применение диагностики на основе NGS технологий представляется целесообразным.

Синдром короткого интервала QT

Синдром короткого интервала QT (СКИQT) - это недавно описанная каналопатия, связанная с предрасположенностью к фибрилляции предсердий и внезапной сердечной смерти, характеризующаяся наличием очень короткого интервала QT на электрокардиограмме (ЭКГ). Синдром наследуется по аутосомно-доминантному типу. Синдром короткого интервала QT вызывается дефектами в тех же ионных каналах, что и синдром длинного интервала QT. На мутации в генах *KCNH2* (СКИQT1), *KCNQ1* (СКИQT2) и *KCNJ2* (СКИQT3) приходится 20% случаев заболевания.

Фибрилляция предсердий

Фибрилляция предсердий (ФП) является наиболее распространенной аритмией, имеющей многофакторную основу; однако описаны семьи с моногенной изолированной формой ФП, наследуемой по аутосомно-доминантному типу. В настоящее время список генов, ассоциированных с семейной ФП, включает *KCNQ1, KCNJ2, KCNE2, SCN5A, KCNA5, NPPA, GJA1, GJA5, ABCC9, SCN1B, SCN2B, NUP155, SCN3B и SCN4B* и продолжает

расти по мере выявления новых уникальных мутаций, предположительно вызывающих ФП.

Аневризма и расслоением грудной аорты

Аневризма и расслоение грудной аорты (АРГА) - это локализованное расширение грудной аорты с увеличением диаметра не менее чем на 50%. Аневризма и расслоение аорты обычно возникают в результате дегенеративных изменений в стенке сосуда и связаны с характерным гистологическим проявлением, известным как «медиальный некроз», при котором происходит дегенерация и фрагментация эластических волокон и потеря гладкомышечных клеток.

АРГА - опасное, но обычно скрыто протекающее заболевание. Во многих случаях первым проявлением является острое расслоение аорты или разрыв, что приводит к высокой смертности, несмотря на прогресс в терапевтическом и хирургическом лечении. Важно отметить, что риск может быть снижен при адекватном и своевременном терапевтическом лечении, направленном на снижение напряжения стенки аорты, или при проведении профилактической операции. Таким образом, целесообразно проводить активный скрининг для выявления людей из группы риска на ранних стадиях заболевания что обусловливает раннюю диагностику заболевания. Более 20% случаев АРГА относятся к семейным формам с аутосомно-доминантным типом наследования и неполной пенетрантностью. Генетический дефект, лежащий в основе заболевания, обнаруживается примерно в 20% случаев. В семейных случаях необходимо дифференцировать изолированную форму АРГА от синдромальных форм. Известно, что АРГА возникают при некоторых заболеваниях соединительной ткани, таких как синдром Марфана, синдром Лойеса-Дитса и синдром Элерса-Данлоса, сосудистый тип и другие.

Синдром Марфана, вызванный мутациями гена фибриллина *FBN1*, относится к генерализованной дисплазии соединительной ткани, которая проявляется главным образом в органах зрения, скелетной и сердечно-сосудистой системах с высоким риском развития АРГА. Сосудистый тип

синдрома Элерса-Данлоса вызван мутациями в генах коллагена *COL3A1* и *COLIA2* и также связан с высоким риском расслоения аорты и разрывов кишечника или матки. Синдром Лойса-Дитца, вызванный мутациями в *TGFBR1* и *TGFBR2*, связан с частым сочетанием АРГА с аневризмами других артерий и более агрессивным течением поражения аорты. Синдром аневризмы-остеоартрита (синдром Лойеса-Дитца 3), вызванный мутациями *SMAD3*, характеризуется не только АРГА и аневризмами других артерий, но также черепно-лицевыми, скелетными и кожными аномалиями и рано начинающимся остеоартритом. АРГА описаны и при аутосомно-рецессивной форме синдрома вялой кожи (Cutis laxa), обусловленной мутаций в гене *FBLN4,* а также при синдроме извилистости артерий, вызванный мутациями *SLC2A10*.

У большинства пациентов семейные случаи АРГА относятся к несиндромальным формам, хотя у них могут быть другие сопутствующие сердечно-сосудистые заболевания. Наиболее частой причиной семейной АРГА являются мутации в гене *ACTA2*, выявляемые в 14% случаев заболевания. Для этого заболевания характерен внутрисемейный полиморфизм проявлений заболевания. Родственники больного с АРГА, имеющие мутацию гена *ACTA2,* могут иметь другие сердечно-сосудистые заболевания, включая преждевременную ишемическую болезнь сердца и ишемический инсульт. Причинами несиндромных форм заболевания, составляющих 3-5% случаев, могут быть и мутации в генах *TGFBR1* и *TGFBR2*. В части случаев семейные несиндромальные форма АРГА обусловлены мутациями в других генах: *MYLK, MYH11, PRKG1, ACTA2, MFAP5* и других.

Серьезность заболевания, требующая ранней диагностики, и чрезвычайно высокая степень генетической гетерогенности является показанием для расширенного генетического тестирования пробандов и проведения семейного скрининга для выявления лиц с высоким риском развития АРГА.

Семейная гиперхолестеринемия

Семейная гиперхолестеринемия (СГХ) - распространенное наследственное заболевание, характеризующееся резким повышением уровня холестерина, липопротеинов низкой плотности с рождения, что способствует отложению холестерина в коже (ксантелазмы), сухожилиях (ксантомы) и коронарных артериях (атеросклероз сосудов) и развитию нарушений со стороны сердечно-сосудистой системы. Ранняя диагностика и лечение СГХ имеют решающее значение, поскольку терапия липидоснижающими препаратами значительно снижает риск таких событий. Распространенность СГХ составляет по разным оценкам от 1/500 до 1/200. Аутосомно-доминантный вариант СГХ вызывается мутациями в генах *LDLR, APOB* и *PCSK9*. Результат генетического тестирования, включающего эти три гена, сильно варьирует по разным данным от 28 до 88% [143]. Аутосомно-рецессивная форма заболевания вызвана мутациями в *LDLRAP1*.

Ситостеролемия - аутосомно-рецессивное заболевание, характеризующееся повышенным всасыванием в кишечнике и пониженным выведением с желчью пищевых стеринов, гиперхолестеринемией и преждевременным коронарным атеросклерозом, вызванное мутациями в генах *ABCG5* и *ABCG8*. Хотя ситостеролемия и СГХ являются этиологически разными заболеваниями, фенотипически они совпадают. Опубликован интересный случай, иллюстрирующий ценность полногеномного секвенирования. WGS был проведен для диагностики 11-месячной девочки на грудном вскармливании с ксантомами и очень высоким уровнем холестерина в плазме. Ее родители были здоровы, и в семейном анамнезе гиперхолестеринемии не было. Известные генетические причины тяжелой гиперхолестеринемии были ранее исключены путем секвенирования ответственных генов (*LDLRAP, LDLR, PCSK9, APOE* и *APOB*). Ситостеролемия была исключена по соотношению ситостерол/холестерин в плазме крови. Однако при проведении WGS были выявлены две нонсенс-мутации в *ABCG5*, что указывает на наличие этого заболевания, хотя и в

нетипичной форме. Эти результаты показывают, что полногеномное секвенирование может быть ценным помощником в диагностике не только редких, но и частых генетически гетерогенных заболеваний с перекрывающимися фенотипическими проявлениями.

Врожденные пороки сердца

Врожденные пороки сердца (ВПС) определяются как структурные и функциональные аномалии, которые возникают внутриутробно и присутствуют при рождении. До недавнего времени роль наследственных факторов в развитии ВПС была недооценена, поскольку большинство пациентов имеют неотягощенный семейный анамнез и расцениваются как спорадические случаи. Одной из причин этого была высокая смертность новорожденных с ВПС, но прогресс в хирургическом лечении ВПС обеспечивает высокую продолжительность жизни больных и возможность деторождения. По данным статистики число взрослых с ВПС постоянно увеличивается, в Европе превышает число больных детей. С течением времени появляется все больше семейных случаев ВПС. Учитывая растущее число семей с повторными случаями ВПС, становится крайне важным улучшить понимание генетики порока, чтобы проводить более эффективное генетическое консультирование. Примеры ВПС, которые могут передаваться по наследству, включают дефекты сердечных перегородок таких как дефект межпредсердной перегородки, дефект межжелудочковой перегородки, дефект атриовентрикулярной перегородки; пороки крупных сосудов, такие как стеноз аортального клапана, коарктация аорты и незаращение артериального протока и более сложные пороки, такие как тетрада Фалло, гипоплазия левого сердца или транспозиция больших артерий.

В группе ВПС выделяют изолированные и синдромальные формы. Среди синдромальных форм генетически детерминированные заболевания представлены как хромосомными, так и моногенными синдромами. Большинство изолированных форм, как правило, имеют сложную мультифакториальную природу. Однако при проведении молекулярно-

генетических исследований в семьях с повторными случаями ВПС были выявлены моногенные формы изолированных ВПС. Таким образом, в настоящее время проблема разгадки причин ВПС лежит на методах NGS, которые уже внесли определенный вклад в выявление каузативных вариантов для ВПС.

Процесс выявления причин сложен из-за генетической гетерогенности, отсутствия больших родословных в сочетании с переменной экспрессивностью и неполной пенетрантностью. Тем не менее в ряде исследований с помощью полноэкзомного секвенирования пациентов с несиндромальными ВПС были выявлены каузативные мутации в генах *MYH6, NR2F2* и других генах. Было подсчитано, что точечные и малые инсерционные/делеционные мутации (indel) de novo могут быть причиной примерно 10-12% случаев тяжелых форм ВПС. Проведенные исследования подчеркивают диагностическую и научную полезность комплексного генетического тестирования в семьях с пороками сердца у детей и предполагают, что секвенирование генома в конечном итоге станет диагностическим тестом первого уровня. Вероятно, многие ассоциации генов с ВПС еще не раскрыты, что требует проведения дальнейших исследований и междисциплинарных усилий проверки результатов.

Резюмируя сказанное выше можно сказать, что технологии NGS оказывают все большее влияние на кардиогенетику. Несмотря на большое количество данных, необходимо проведение дальнейших исследований для оценки значения выявляемых изменений, решения проблем интерпретации результатов. Для кардиологов и других врачей, занимающихся диагностикой и лечением наследственных заболеваний сердца, важно понимать возможности, а также ограничения этой новой технологии.

3.3. Секвенирование нового поколения в дизморфологии

Дизморфология – одно из направлений медицинской генетики, которое занимается изучением синдромов, проявляющихся врожденными пороками развития (ВПР). Как правило, дизморфологический синдром включает в себя или характеризуется определенным сочетанием пороков развития. В широком смысле слова термин «дизморфический» используется для описания нехарактерных для нормы или необычных признаков, выявляемых при физикальном обследовании пациента, причем большинство дизморфических признаков относится к лицевой области и дистальных отделах конечностей (стопы, кисти). Задачей дизморфологии является интерпретация, анализ и возможные объяснения причин наблюдаемых паттернов нарушений развития и врожденных дефектов. Врожденные дефекты включают мальформации, дизрупции, деформации и дисплазии. Разделение на эти группы определяется причинами и механизмами возникновения пороков развития. Так, к мальформациям относятся пороки, возникающие в результате внутренних причин, в основном, в результате генетических нарушений (мутаций). К дизрупциям относятся пороки, возникающие в результате воздействия на эмбрион внешних повреждающих факторов. Деформации обусловлены изменением формы или положения органа вследствие механических причин. Дисплазии связаны с нарушением формирования тканей (дисгистогенез).

Врожденные пороки представляют собой одну из наиболее частых и важных причин направления на медико-генетическую консультацию и соответственно генетические обследования. Как известно, в среднем частота врожденных дефектов среди новорожденных составляет 2-4%. В эту группу входят как изолированные, так и множественные пороки развития, среди которых есть частые и редкие формы.

Классический диагностический подход в дизморфологии состоит из следующих этапов:

- сбор родословной (глубина до трех поколений);

- сбор анамнеза (течение беременности и родов, неонатальный период, этапы развития, текущее физическое и интеллектуальное развитие), жалобы, симптомы;

- физикальное обследование (антропометрическое обследование, дизморфологическое обследование);

- дополнительные данные (лабораторные и инструментальные исследования);

- клинический и дифференциальный диагноз;

- дополнительные специальные обследования (генетические и биохимические тесты);

- заключительный диагноз.

Детальный сбор истории болезни и тщательное физикальное обследование пациента составляют существенную часть диагностического процесса. Для диагностики дизморфологических синдромов используются компьютерные базы данных, например, Лондонская база по дизморфологии, австралийская база Possum.

Генетическое тестирование в дизморфологии

Следует подчеркнуть, что синдромы с врожденными пороками развития могут иметь разное происхождение. В этой группе могут быть нарушения не только генетической природы, но и связанные с внешнесредовыми воздействиями (тератогенные синдромы).

Генетическая этиология при дизморфических нарушениях у детей может предполагаться в случаях:

- наличия множественных врожденных аномалий (например, несколько грубых пороков развития или один грубый порок развития в сочетании с малыми аномалиями);

- нарушения роста (низкий или высокий рост);

- задержки развития и умственной отсталости или регресса развития;

- сочетаний нарушения умственного развития с малыми аномалиями развития;

- нарушения развития вторичных половых признаков;

- двойственного строения гениталий.

До настоящего времени для определения генетической причины врожденных аномалий требовалось проведение различных трудоемких диагностических и/или научных исследований (например, анализ сцепления, анализ генов-кандидатов, секвенирование отдельных генов и др.). В настоящее время для больных с недиагностированными множественными ВПР (МВПР) согласно международному консенсусу выбором первой линии является хромосомный микроматричный анализ (ХМА). В качестве начальной диагностической оценки пациентов с множественными дефектами, не характерными для хорошо известных генетических синдромов, рекомендуется тестирование на вариации числа копий участков ДНК (CNV). Исследование определяет наличие лишних или отсутствие целых хромосом или делеции/дупликации фрагментов хромосом. Различные специализированные генные панели на основе NGS составляют вторую линию тестирования. Если в результате тестов 1-й и 2-ой линий не удалось поставить диагноз, целесообразно проведение полноэкзомного/полногеномного секвенирования. Такой подход позволяет поставить диагноз в 20-25% случаев сочетаний умеренной или тяжелой умственной отсталости с пороками развития или дизморфическими признаками.

После постановки точного генетического диагноза становится возможным проведение обоснованного медико-генетического консультирования и пренатальной диагностики, а также осуществление соответствующего клинического ведения пациента и поддержки семьи.

Благодаря прогрессу в геномных технологиях удается установить генетическую причину выделенных ранее клинически дизморфических синдромов. Введение новых цитогенетических и молекулярных лабораторных технологий позволило выделить целый ряд новых синдромов. Так, в одном крупном исследовании, проведенном в рамках программы «Расшифровка нарушений развития» в Великобритании было проведено полногеномное

микрочипирование и секвенирование генома у детей с недиагностированными нарушениями развития и их родителей. В результате секвенирования генома и микрочипового анализа были идентифицированы около 80000 геномных вариантов, из которых примерно 400 были редкими и, по прогнозам, вызывали изменение белка. Среди 1133 детей с нарушениями развития было выявлено 27% клинически значимых вариантов. Важно отметить, что исследование трио (ребенок-родители) привело к 10-кратному сокращению числа потенциальных причинно-следственных вариантов, требующих клинической оценки, по сравнению с секвенированием только ребенка. Большинство диагностических вариантов, идентифицированных в известных генах, были новыми и не присутствовали в базах данных известных вариантов заболеваний.

NGS тестирование в дизморфологии и редкие синдромы с МВПР

NGS технологии изменили подход к изучению редких синдромов со множественными нарушениями. NGS технологии зарекомендовали себя как точный инструмент выявления мутаций, вызывающих менделирующие нарушения. С 2012 года открытие новых генов для редких менделирующих синдромов, включая дизморфические синдромы, с использованием NGS технологий выросло быстрыми темпами.

В результате использования NGS открыты:

-новые гены, связанные с известными дизморфическими синдромами;

-новые гены, вызывающие ранее неизвестные синдромы;

-новые гены, связанные с новыми синдромами, относившимися ранее к атипичным проявлениям известных нарушений.

Таким образом, пациенты с редкими дизморфическими синдромами находятся среди первых «бенефициаров» NGS тестирования.

Первыми синдромами, для которых с помощью NGS были выявлены каузативные мутации, были аутосомно-доминантный кранио-карпо-тарзальный синдром Фримана-Шелдона (ген *MYH3*), аутосомно-рецессивный синдром Миллера (ген *DHODH*). На этих синдромах было впервые продемонстрировано, как с помощью NGS на небольшом числе

неродственных между собой пациентов можно идентифицировать ген, вызывающий заболевание. NGS тестирование было впервые применено и для выявления соматических мутаций de novo как причины генетических заболеваний при синдроме Протея (синдром частичного гигантизма).

Крайне полезно применение NGS в тех случаях, когда мутации в разных генах могут вызывать один и тот же синдром (генетическая гетерогенность). Классическим примером является синдром Коффина-Сириса, для которого идентифицировано 12 различных генов, вызывающих развитие синдрома.

Очевидным показанием для дифференциальной диагностики с помощью применения NGS являются заболевания с перекрывающимися фенотипическими проявлениями. Примером являются заболевания «фенотипического спектра синдрома Нунан», известные как RASопатии. Это группа синдромов характеризуется клиническим полиморфизмом и генетической гетерогенностью, но при этом со значительным перекрыванием фенотипических проявлений.

RASопатии обусловлены нарушением или дизрегуляцией одного и того же сигнального пути RAS/MARK (RAS/mitogen-activated protein kinase). Выявлены 13 генетических вариантов у пациентов с синдромом Нунан или Нунан-подобными синдромами. Большинство мутаций спектра синдрома Нунан являются новыми или de novo мутациями (в основном миссенс или indels, приводящие к нарушению рамки считывания), хотя описаны и семейные случаи. Все они наследуются аутосомно-доминантным путем.

RASопатии включают: синдром Нунан, синдром LEOPARD, кардио-фацио-кожный синдром, синдром Костелло, нейрофиброматоз -1 и синдром Legius.

Синдром Нунан - аутосомно-доминантное заболевание, характеризующееся низкорослостью, лицевыми дизморфиями и врожденными пороками сердца. Черепно-лицевые аномалии включают широкий лоб, гипертелоризм, косой разрез глазных щелей, высокое арковидное небо, низко расположенные ушные раковины. Поражение сердца

присутствует у 90% больных, чаще всего встречается легочный стеноз и гипертрофическая кардиомиопатия, но также наблюдаются дефекты межпредсердной перегородки, дефект атрио-вентрикулярного канала. Относительно частыми признаками являются дефекты скелета (деформации грудной клетки и позвоночника), крыловидные шейные складки. Интеллект обычно нормальный. Синдром характеризуется выраженным клиническим полиморфизмом, включая внутрисемейный. Примерно в половине случаев обусловлен миссенс мутациями в гене *PTPN11*, приводящими к потере функции белка тирозинфосфатазы SHP-2. В других случаях СН обусловлен мутациями в других генах, т.е. синдром генетически гетерогенен.

Синдром LEOPARD (синдром множественных лентиго). Название синдрома представляет собой аббревиатуру наиболее частых проявлений синдрома: множественные лентиго (L), нарушения электрокардиографической проводимости (E), глазной гипертелоризм (O), легочный стеноз (P), аномалии гениталий (A), задержка роста (R) и нейросенсорная глухота (D). В 90% случаев синдром вызван мутациями в гене *PTPN1*, в остальных случаях - мутациями в генах *RAF1* и *BRAF*. В отличие от СН мутации в гене *PTPN1* при синдроме LEOPARD приводят к доминантному негативному эффекту.

Кардио-фацио-кожный синдром характеризуется необычными лицевыми проявлениями, пороками сердца и умственной отсталостью. Типичные черты лица включают высокий лоб с битемпоральным сужением, гипоплазию надбровных дуг, косые глазные щели, вдавленную переносицу, ротированные назад ушные раковины с выступающими завитками. Пороки сердца включают стеноз легочной артерии, дефект межпредсердной перегородки и гипертрофическую кардиомиопатию. Отмечаются эктодермальные аномалии, такие как редкие волосы, гиперкератоз, ихтиоз, пигментные пятна, дистрофия ногтей. Характерен низкий рост, неврологические нарушения (гипотония, судороги, когнитивные нарушения). Абсолютное большинство случаев спорадические, но сообщается об

аутосомно-доминантной передаче заболевания, а также отмечается повышенный возраст отцов в спорадических случаях (средний возраст 39 лет). Синдром генетически гетерогенен: большая часть случаев обусловлена мутациями в гене *BRAF,* но описаны случаи синдрома с мутациями в генах *KRAS, MAP2K1 и MAP2K2*. Белковые продукты этих генов взаимодействуют в общем пути RAS, который регулирует дифференцировку, пролиферацию и апоптоз клеток.

Синдром Костелло характеризуется грубыми чертами лица, утолщенной и избыточной кожей на шее, ладонях и подошвах, папилломами в носогубной области. Волосы редкие, кудрявые. Дети отстают в умственном развитии, росте. Для синдрома характерны пороки сердца и скелета. Большинство случаев спорадические, возникающие в результате мутаций de novo гена *HRAS*.

Таким образом, диагностические трудности в рассмотренных выше примерах указывают на значимую роль NGS технологий как диагностического инструмента в дизморфологии. NGS технология помогает понять патогенез заболевания через выявление патогенетических путей.

Кроме того, исследования на основе NGS открывают возможности для разработки новых терапевтических подходов к лечению редких болезней. К примеру, выявление мутаций в генах транспортера рибофлавина (*SLC52A2* и *SLC52A3*), вызывающих синдром инфантильной нейросенсорной тугоухости, бульбарной дисфункции и выраженной диффузной мышечной слабости, дало возможность применения рибофлавина в качестве терапевтического агента.

Очевидно, что NGS технология становится частью стандартного исследования большинства редких дизморфических синдромов, поскольку это значительно облегчает, ускоряет и сокращает процесс диагностики.

Обратная дизморфология

Технология NGS ведет к смене парадигмы в области дизморфологии благодаря возможности идентификации генетических синдромов с помощью процесса, называемого обратной дизморфологией, то есть выделения новых

синдромов по генотипу с последующим выделением фенотипической картины синдрома. Такой подход может быть полезным в диагностике синдромов с гетерогенными локусами, включая синдромы с МВПР и нарушением интеллектуального развития, а также аутизмом и эпилепсией. Новый подход «сначала генотип» указывает на фенотип, имеющийся у всех пациентов с одним и тем же генетическим вариантом.

Обратная дизморфология как диагностический процесс была описана у большой группы пациентов, когда в диагностике начали использовать CGH с высоким разрешением, что позволило связать новые критические хромосомные области с новыми фенотипами и дизморфическими синдромами. Соответственно, с помощью NGS можно идентифицировать мутацию в гене, вызывающем заболевание, что заставит клиницистов пересмотреть фенотип и поставить правильный диагноз, совместимый с обратным фенотипированием.

Новые проблемы

Внедрение NGS, открытие новых генов и прогресс диагностики предсказывает значительную трансформацию в рутинной практике медицинской генетики и дизморфологии. NGS тестирование изменит традиционную диагностику на основе фенотипа. Включение NGS в диагностический процесс поможет врачам значительно улучшить диагностический процесс.

В настоящее время дизморфологи пытаются точно определить основные клинические проблемы, собирая клинические и лабораторные данные и проводя дифференциальную диагностику, что облегчает выбор таргетного генетического тестирования для подтверждения клинического диагноза. В будущем дизморфологи вероятно будут проводить более точное или глубокое фенотипирование для облегчения интерпретации большого количества данных, получаемых при NGS тестировании. Определение фенотипов для генетического исследования является очень сложной задачей, поскольку фенотипирование должно соответствовать высоким стандартам

воспроизводимости и достоверности. R. Hennekam с соавт. убеждены, что развитие NGS потребует так называемого «фенотипирования следующего поколения» и трансформации профессии медицинского генетика и дизморфолога. При использовании NGS диагностический процесс ускоряется, но исследование фенотипа остается существенной задачей и опыт дизморфолога становится еще более необходимым.

Главные вопросы для врачей, также как для пациентов и их родителей, включают основные показания для NGS тестирования, информированное согласие, случайные находки, и право пациента и их родителей знать или не знать.

NGS исследования идентифицируют гораздо больше вариантов, которые, как предполагается, могут быть мутациями, вызывающими заболевание. Как было отмечено ранее, выделяют 5 категорий генетических вариантов в диагностическом тестировании, среди которых есть варианты с неизвестной клинической значимостью. В каждом индивидуальном геноме могут быть сотни вариантов с неизвестной клинической значимостью. Это указывает на сложности интерпретации выявляемых при NGS вариантов. Кроме того, как случайные (или вторичные) находки, в процессе исследования могут быть выявлены мутации, вызывающие заболевания во взрослом возрасте, например, мутации, вызывающие онкологические или нейродегенеративные заболевания. До настоящего времени нет единого мнения о том, как сообщать эту информацию пациенту. Таким образом, несмотря на несомненные преимущества NGS, ясно также, что эта технология, как и геномная медицина в целом, позволяющая получать персональные генетические данные, продуцирует и определенные этические проблемы, требующие своего разрешения.

В заключении следует сказать, что своевременная и правильная диагностика дизморфологического фенотипа в раннем возрасте важна для обеспечения надлежащей медицинской помощи и обоснованного медико-генетического консультирования семьи. В части случаев дизморфологические

синдромы могут быть выявлены путем детального клинического обследования в сочетании с кариотипированием или применением CGH для выявления геномного дисбаланса. Но эти подходы не всегда успешны. Генетическое тестирование на основе NGS – потенциальный инструмент для выявления точек разрывов всех типов сбалансированных хромосомных перестроек, подтверждающих повреждение гена, ответственного за формирование фенотипа. Предполагается, что дизморфический пациент подлежит NGS-тестированию после исключения геномного дисбаланса. Такая процедура повышает диагностический результат до 30%. NGS также является мощным инструментом, позволяющим интерпретировать варианты с неопределенным значением или с неполной пенетрантностью, часто встречающихся при врожденных пороках развития. Сочетание всех новых инструментов и методов геномики в исследованиях и диагностике, включая технологии NGS, делает дизморфологию очень интересной и быстро развивающейся дисциплиной клинической генетики. Параллельное совершенствование фенотипирования и генотипирования и их взаимодействие может облегчить молекулярную диагностику в дизморфологии, а также расширить знания о патогенезе этих заболеваний.

3.4. Секвенирование нового поколения при нарушениях слуха и зрения

Нарушения слуха и зрения могут возникать как в результате генетических, так и экзогенных факторов или их комбинации. В OMIM - современном компендиуме генов человека и соответствующих фенотипов – 25-30% болезней в своем описании имеют в качестве симптома поражение зрения. Нарушения зрения и слуха встречаются в большом числе синдромальных состояний.

Успехи в генетике в течение последних десятилетий пролили свет на молекулярную основу большого числа нарушений зрения и слуха. Генные мутации выявлены в наследственных моногенных заболеваниях, особенно с ранним началом, а генетические варианты играют все большую роль в развитии частых поздно развивающихся сложно наследуемых заболеваний. Примерами таких заболевания являются глаукома, миопия, возраст-зависимая макулярная дегенерация или возраст-зависимые нарушения слуха. Идентификация генетической компоненты в заболеваниях зрения и слуха значительно ускорилась при использовании современных технологий, таких как микрочипы и NGS.

В настоящее время идентифицировано более 500 генов, вызывающих нарушение зрения, более 120 генов, вызывающих только несиндромальные формы нарушения слуха. Выраженная генетическая гетерогенность особенно характерна для несиндромальных форм нарушения слуха, пигментного ретинита, амавроза Лебера, синдрома Ушера. Последовательный скрининг всех генов при этиологически гетерогенных заболеваниях, не имеющих четких корреляций между гено-и фенотипом, займет много времени, дорог и неэффективен. В этой связи технологии массового параллельного секвенирования стали главным инструментом генетического анализа нарушений зрения и слуха.

Многие заболевания глаз характеризуются выраженной генетической гетерогенностью, что значительно затрудняет их диагностику. Например, для

пигментного ретинита известно 52 гена, вызывающих заболевание. Доступность и эффективность применения экзомного/геномного секвенирования для пациентов с генетически гетерогенными заболеваниями изучалась в различных исследованиях. В ряде работ показан огромный диагностический потенциал и клиническая польза NGS для диагностики пигментного ретинита, достигаемые за счет выявления мутаций, включая мутации de novo.

В ретроспективном сравнении секвенирования по Сэнгеру и секвенирования экзома для диагностики глухоты и слепоты Neveling et al предоставили данные, подтверждающие, что NGS имеет высокую диагностическую ценность. В этом исследовании общее количество генов, предложенных для тестирования при секвенировании экзома, составило 104 гена глухоты и 164 гена слепоты. С введением экзомного/геномного секвенирования детекция мутаций при слепоте выросла вдвое по сравнению с данными, полученными при секвенировании по Сэнгеру (52% против 25%), в то время как для глухоты увеличение было в четыре раза (44% против 10%).

Принимая во внимание значительную эффективность генетического тестирования для глухоты, Американская коллегия медицинской генетики рекомендует в диагностике нарушений слуха использовать панельные тесты в качестве первого метода выбора. Потеря слуха является распространенным и сложным состоянием, которое может возникнуть в любом возрасте, может быть унаследовано или приобретено и связано с чрезвычайно широким спектром причин. Разнообразие причин потери слуха в сочетании с весьма изменчивыми и часто перекрывающимися проявлениями различных форм потери слуха ставят под сомнение способность с помощью традиционных клинических оценок ставить этиологический диагноз для многих глухих и слабослышащих людей. Тем не менее, определение этиологии потери слуха может повлиять на клиническое ведение пациента, повысить точность прогноза и оценки вероятности повтора для родственников глухих и слабослышащих людей, улучшить медико-генетическое консультирование. В

одном из исследований показано, что окончательный диагноз при проведении WGS был поставлен в 66% случаев.

NGS тестирование не только повышает эффективность генетической диагностики, но также дает возможность выявления дополнительных мутаций, которые потенциально могут вносить вклад в фенотип, т.е. кумулятивный мутационный груз. Как оказалось, пациенты с несиндромальной глухотой имеют гораздо большее число генетических вариантов по сравнению с контролем.

В целом результаты NGS исследований показывают, что de novo мутации играют значимую роль для пигментного ретинита и глухоты.

Данные NGS могут быть проанализированы не только качественно, но и количественно, позволяя обнаружить CNV и, таким образом, дополняя данные MLPA и XMA. Shearer et al. с помощью массового параллельного секвенирования определили CNV как довольно частый фактор, способствующий развитию несиндромальной глухоты. Наибольшее число CNV обнаружено в генах *STRC* и *OTOA,* отвечающих за моногенные формы глухоты, составляя 73 и 13% соответственно от всех выявленных CNV. Частота носительства делеции региона *STRC*, самой частой CNV, составила в проведенном исследовании 4,7%. Данные указывают на то, что делеции региона *STRC* в некоторых популяциях могут быть более частыми, чем частота носительства наиболее частых мутаций гена коннексина *GJB2,* вызывающего глухоту.

С помощью NGS различные каузативные CNV были выявлены и при дистрофии сетчатки. CNV наиболее часто выявлялись в гене аутосомно-доминантного пигментного ретинита *PRPF31*. CNV были выявлены в 5’-UTR участке гена *EYS* и в пределах кодирующей последовательности гена *CRX*. В представленных случаях идентификация CNVs имела решающее значение для выявления ранее неизвестных причин поражения зрения.

Появление NGS значительно ускорило процесс обнаружения новых генов для менделирующих заболеваний, включая нарушения слуха и

генетические заболевания зрения. Гены, идентифицированные при нарушениях слуха, вовлечены в несколько различных механизмов, обеспечивающих надлежащее функционирование кортиева органа. Аналогичным образом в ходе геномных исследований с использованием NGS у пациентов с пигментным ретинитом были обнаружены новые гены, участвующие в развитии заболевания. Одним из первых генов, обнаруженных с помощью WGS у пациентов с пигментным ретинитом, был ген *DHDDS*, который кодирует дегидродолихил дифосфат синтазу. Мутации в этом гене в гомозиготном или компаунд-гетерозиготном состоянии вызывают развитие пигментного ретинита. Затем были выявлены и другие гены, мутации в которых приводят к развитию заболеваний органов зрения. Например, ген *RAB28,* мутации в котором приводят к дистрофии колбочек и палочек.

Таким образом, современные генетические технологии успешно используется для диагностики наследственных нарушений зрения и слуха. Примерно у 50% пациентов может быть выявлена генетическая основа этих нарушений при использовании NGS технологий. Ключевой проблемой является отличие патогенных от непатогенных вариантов, которые выявляются у пациентов. Классификация этих вариантов основана на их частоте среди пациентов и в контроле с учетом этнической принадлежности, косегрегации их с болезнью в семьях, прогнозировании in silico и, если возможно, с учетом результатов исследований in vitro или in vivo. Вероятно, что в будущем генетическая информация, специфичная для пациента, будет включена в программу обследования пациентов для лучшего предсказания результатов сложного генетического исследования.

3.5. **Общий подход применения NGS при недиагностированных редких заболеваниях**

К недиагностированным заболеваниям чаще относятся редкие и ультраредкие заболевания или новые, ранее неописанные заболевания, или заболевания с очень необычными, вводящими в заблуждение фенотипами.

В зависимости от принятых критериев «редкости» в Европе к редким заболеваниям относятся болезни с частотой ниже 1:2000 населения, в США – к редким заболеваниям относится болезнь, от которой страдают менее 200000 человек. В России редкое заболевание – это заболевание с распространенностью 1 на 10000 населения. Несмотря на редкость каждого заболевания, в совокупности редкие болезни составляют около 7000 болезней, из них 80% имеют генетическую причину.

Недиагностированные заболевания являются хорошей моделью для клинического применения новых геномных технологий. Когда у пациента выявляются неспецифические симптомы, генетическое тестирование отдельных генов, как правило, неинформативно. Большинство случаев редких или необъяснимых состояний могут быть диагностированы только с помощью геномных подходов. Современная технология секвенирования нового поколения в сочетании с другими генетическими тестами является оптимальной стратегией для повышения эффективности установления диагноза у пациентов с редкими заболеваниями.

Большинство редких заболеваний возникает в результате большого спектра патогенных вариантов, включая различные генные мутации, вариации числа копий, крупные делеции или дупликации или другие крупные геномные изменения. Клинический анализ и семейный анамнез определяют приоритеты в анализе различных областей генома в зависимости от фенотипа или предполагаемой схемы наследования. В настоящее время для исследования генома при редких заболеваниях используется одна из двух стратегий: *целенаправленная* – секвенирование конкретного гена, использование панели

генов или секвенирование экзома (WES) или *нецеленаправленная* - секвенирование всего генома (WGS).

В большинстве доступных клинических исследований использовалась целевая стратегия. Выбор целевого подхода обычно оправдан более низкой стоимостью по сравнению с WGS, более простой интерпретацией полученных данных, приоритетом лучшего соотношения сигнал/шум над равномерностью покрытия, а также предположением, что клинически наиболее важные варианты расположены в белково-кодирующих регионах.

Генные панели широко используются для диагностики наследственных заболеваний. Генные панели включают набор предварительно выбранных генов. Как самая простая и достаточно дешевая стратегия, такой вид тестирования может быть достаточным для диагностики ряда необъяснимых состояний.

WES стал успешным диагностическим инструментом при редких генетических заболеваниях, особенно эффективным в выявлении вариантов, которые не поддаются анализу сцепления. Недавно Zhu и др. применили трио WES в когорте из 119 пациентов с недиагностированными заболеваниями для выявления как известных, так и новых генов. Генетический диагноз был поставлен в 24% случаев, из которых почти половина были обусловлены мутациями de novo. Однако точный диагноз можно было поставить только в том случае, если каузативный ген ранее был связан с аналогичным заболеванием. Критическим фактором для подхода WES к недиагностированным пациентам является охват только белково-кодирующих областей, что должно позволить обнаружить изменения во всех этих областях.

Полногеномное секвенирование имеет значительные преимущества перед полноэкзомным, поскольку охватывает большую «площадь», включая некодирующие регионы. В ряде исследований выявлена важная роль некодирующих вариантов в регуляции экспрессии генов и функции генома, предполагающая, что некоторые некодирующие варианты могут вызывать заболевания с серьезными последствиями. Новые варианты, вызывающие

заболевания, были идентифицированы в некодирующей области генома. Этот подход не нуждается в предварительных гипотезах, которые часто необходимы при недиагностированных заболеваниях. WGS легче использовать для дифференциации гемизиготности от гомозиготности, поскольку в отличие от WES распределение глубин считывания для однокопийных (гемизиготных) и двухкопийных (дизиготных) состояний в ходе WGS не перекрывается.

В практических ситуациях кариотипирование, флуоресцентная гибридизация in situ и ХМА могут использоваться в качестве скринирующих методов, предшествующих секвенированию генома. Данные ХМА могут быть использованы для определения структурных вариаций, которые трудно обнаружить с помощью WES. Например, данные микрочипов SNV могут быть использованы для поиска вариаций числа копий, сегментов рекомбинации, мозаицизма и областей гомозиготности.

Анализ результатов тестирования для редких заболеваний

Для определения приоритетности вариантов, выявленных в результате секвенирования, результаты NGS-тестирования должны быть отфильтрованы с использованием баз данных, таких как база данных 1000 геномов, NHLBI-ESP5400, CG46 или база данных ExAC. Для каждого пробанда обычно исключаются варианты, найденные в этих базах данных с частотой аллелей>1%, хотя этот порог может не учитывать некоторые частые рецессивные мутации. Во многих случаях будут обнаружены новые варианты. Также важно, чтобы эти новые варианты были хорошо определены и внесены в базы данных. Созданные пользовательские алгоритмы отбирают варианты в соответствии с такими критериями, как качество варианта, характер наследования, связь между вариантом и структурой и функцией белка. Программное обеспечение для анализа последовательностей должно поддерживать сборку фрагментов для анализа, включая как прямое, так и обратное направление секвенированных и перекрывающихся фрагментов, референсную последовательность cDNA и геномную референсную

последовательность. Petrovski и др. ввели биоинформационную характеристику «горячей зоны» для приоритета мутаций de novo среди других вариантов. По мнению некоторых авторов, сравнение мутаций «горячей зоны» de novo в случаях заболевания по сравнению с контролем представляет собой новый инструмент понимания генетики редких заболеваний. Среди генов с мутацией de novo в горячей зоне некоторые являются патогенетическими, а другие не связаны с болезнью. Такой подход может помочь найти причину тяжелых редких заболеваний.

Анализ геномных данных от пациентов с недиагностированными заболеваниями может быть полезен при получении последовательностей от членов семьи для фильтрации вариантов, сегрегация которых не соответствует ожидаемой менделевской модели. Анализ данных по некодирующим вариантам более сложен, поскольку алгоритмы функционального предсказания некодирующих вариантов гораздо менее разработаны, чем кодирующих. Поскольку более 99% вариантов в данных WGS являются некодирующими, количество неэкзомных редких вариантов все еще выше, чем количество полноэкзомных вариантов без предварительной фильтрации. Поэтому очень важно применять четко определенные критерии фильтрации и биоинформационные инструменты определения приоритетов в отборе вариантов, которые, скорее всего, являются релевантными. Кроме того, для определения приоритетности некодирующих вариантов следует применять подходы функционального прогнозирования. Несмотря на все более широкое клиническое применение WGS, многие предпосылки для успешной диагностики лучше всего реализуются в исследовательских условиях. Все это подчеркивает важную роль генетиков-исследователей в проведении диагностических WES и WGS.

SNV-чипы и aCGH предоставляют дополнительные геномные данные, которые могут быть использованы для дополнения и улучшения анализа данных NGS при недиагностированных заболеваниях. В частности, при подозрении на мозаицизм или однородительскую дисомию данные SNV

предпочтительнее данных WES. В настоящее время добавление SNV-чипа к секвенированию экзома является альтернативной и менее дорогостоящей стратегией по сравнению с WGS. Другая стратегия обнаружения потенциально значимых вариантов, связанных с редким заболеванием, заключается в объединении результатов анализа NGS, SNV и CNV с использованием соответствующих биоинформационных методик. Данные SNV можно отфильтровать с помощью общедоступных баз данных, таких как dbSNP 130, dbSNP 131 или 1000 Genomesproject. Если у пациента обнаружен однонуклеотидный вариант, лаборатория должна определить, является ли он признанным SNV, не имеющим клинического значения; это можно сделать путем поиска в открытых базах данных SNV и/или путем изучения значительного числа нормальных последовательностей. Грубые изменения (делеции, дупликации или перестройки) могут быть обнаружены в некоторых анализах секвенирования. Тем не менее, информация о таких вариантах в доступных базах данных скудна, поскольку они не являются предметом рутинного тестирования. Важным вопросом в генетическом тестировании недиагностированных заболеваний является ситуация, когда получен нормальный результат генетического тестирования. Невыявление мутация может быть результатом: (1) природы мутации, например, делеции или дупликации; (2) наличия мутаций вне тестируемых областей, например, в промоторе; (3) наличия неожиданной вариации у конкретного пациента в месте связывания праймеров, что приводит к выпадению аллеля или преимущественной амплификации конкурирующего аллеля; или (4) мозаицизма.

Заключительным этапом геномного анализа является оценка патогенности, которая должна проводиться с осторожностью, поскольку она может быть источником ошибок, а имеющиеся методы и программы для оценки патогенности вариантов не вполне надежны. Отсутствие четких критериев для классификации патогенности вариантов является острой проблемой в геномной медицине. Можно применять программное

обеспечение для определения вероятности функционального влияния варианта на белок.

Наконец, полученные результаты должны быть подтверждены функциональными исследованиями для доказательства того, что измененный продукт мутантного гена может играть роль в патогенезе заболевания, и, если возможно, демонстрацией ассоциации с заболеванием у независимых пациентов. Окончательной проверкой для любого из этих неклассифицированных вариантов будет разработка функционального анализа для проверки того, влияет ли выявленный вариант на функцию белка. Существует очень мало примеров такого теста в клинической лаборатории. В качестве иллюстрации, Bouwman и др. описали высокопроизводительный анализ для функциональной классификации вариантов последовательности BRCA1 с неизвестным значением. Этот функциональный тест на основе cDNA для классификации BRCA1 основан на способности функционально дополнять BRCA1-дефицитные эмбриональные стволовые клетки мыши в контексте полноразмерного белка. С помощью этого теста были успешно проанализированы 74 неклассифицированных миссенс-мутации BRCA1, для которых все патогенные варианты были ограничены доменами BRCA1, RING и BRCT.

Необходимо оценить, действительно ли вариант связан с редким заболеванием. В идеале, как минимум две рецензируемые публикации должны предоставлять убедительные доказательства участия конкретного гена в развитии заболевания. Особую осторожность следует проявлять при рассмотрении расстройств, при которых: (1) фенотип может быть обусловлен взаимодействием нескольких локусов; (2) мутации более чем в одном гене могут независимо приводить к фенотипу; (3) существуют фенокопии нарушения, обусловленные другими генами, кроме тестируемого; (4) клиническая картина, связанная с мутацией, плохо определена. Для интерпретации значения наблюдаемого варианта очень важно определить, существует ли сопряженность варианта с фенотипом и отсутствие мутации у

клинически не пораженных членов семьи. Интерпретация зависит от типа наследования - аутосомно-доминантного, рецессивного или X-сцепленного. При аутосомно-доминантных заболеваниях, если один из бессимптомных родителей имеет мутацию или CNV, маловероятно, что изменение имеет значение. Однако, если вариант возник de novo, вероятность того, что он является причинным, выше. Варианты неизвестной значимости при аутосомно-рецессивных заболеваниях могут быть более сложными для интерпретации.

Как было описано выше, принятые рекомендации по определению клинической валидности тестов для распространенных генетических заболеваний не совсем применимы к редким заболеваниям из-за недостатка данных. Тем не менее, все лаборатории обязаны проверить свой конкретный анализ на ряде образцов с известной информацией о последовательности, а затем на серии слепых образцов, содержащих разнообразный набор мутаций. ACMG разработала «Рекомендации по стандартам интерпретации последовательностей», чтобы помочь клиническим лабораториям в интерпретации геномных вариантов. Очень важно оценить, является ли вариант патологическим или доброкачественным. Критические моменты, которые необходимо учитывать при разработке теста, включают наличие псевдогенов или других гомологичных генов. Псевдогены - это последовательности геномной ДНК, характеризующиеся высоким сходством с соответствующими кодирующими генами. Псевдоген с высокой долей идентичности кодирующей последовательности делает невозможным использование NGS для скрининга генов, и рекомендуется протокол секвенирования по Сэнгеру, исключающий псевдоген.

Псевдогены возникают в результате дублирования последовательности ДНК или ретротранспозиции и последующей реинтеграции cDNA в геном. Из-за высокого сходства последовательностей со своими аналогами псевдогены являются причиной ошибок в процессе NGS (ПЦР/обогащение мишеней) и ошибок в базе данных (картирование чтений), вызывая ложноположительные

сигналы и диагностические ошибки. Эта проблема также может быть результатом короткой длины чтения, производимого некоторыми платформами NGS (SOLiD и Illumina), и неоднозначного отображения при выравнивании. Для предотвращения таких неверных интерпретаций можно использовать программы выравнивания последовательности (например, FASTA или BLAST) для обнаружения совпадающих регионов в последовательности ДНК. Такие инструменты позволяют кластеризовать гены из аннотированных геномов в семейства аналогов, которые в дальнейшем используются для проверки всего генома на наличие копий или гомологов. Впоследствии каждая совпадающая последовательность подтверждается как псевдоген путем поиска повторяющихся элементов, перекрытия с другими гомологами и перекрестных ссылок на экзоны из геномных аннотаций. Идентифицированные псевдогены далее относят к семейству парологов наиболее гомологичного гена (или относят к синглетному гену, если очевидный паралог не был найден). Описаны многочисленные примеры того, как наличие псевдогена мешает диагностике. Например, идентификация делеции STRC, ответственной за потерю слуха, была нарушена присутствием непроцессированного псевдогена с 98,9% геномной и 99,6% кодирующей последовательности. Эта структура была расположена в регионе, охватывающем дупликацию с четырьмя генами: *CATSPER2, HISPPD2A, STRC* и *CKMT1A*. Vona и др. разработали метод секвенирования по Сэнгеру для исключения псевдогена STRC. Более того, Knies и др. признали эту проблему при анемии Фанкони (АФ). Эти авторы показали, что мутация c.2314G-T, отнесенная к *FANCD2*, была вызвана неправильным отображением вариант-содержащих чтений, соответствующих псевдогену *FANCD2-P2*. Другая миссенс-мутация (c.2204G - A) также соответствует последовательности псевдогена *FANCD2-P2*. В том же экзоне эти авторы идентифицировали еще две замены оснований, представляющие псевдогенную последовательность, но соответствующие чтения были ошибочно сопоставлены с *FANCD2*. Только ген-специфическое повторное секвенирование позволило установить

правильную последовательность. Эти авторы делают вывод, что в отношении генов АФ особое внимание следует уделить *FANCD2,* для которого в базе данных NCBI указан *FANCD2-P1* LOC100421239, но не указан другой псевдоген, *FANCD2-P2*.

Важность генетической диагностики при редких заболеваниях

Для пациентов и их семей получение окончательного диагноза имеет большое значение, т.к. этим завершается период неопределенности. Правильный диагноз может повлиять на репродуктивные планы семьи. В некоторых случаях возможно изменение ведения пациентов в зависимости от генотипа, включая новые препараты-кандидаты, определенные диеты или изменение образа жизни.

На основе «геномного профиля» пациента основаны попытки разработать новые терапевтические стратегии (геномно-перспективная медицина). Выбор терапевтической стратегии основывается на потенциальных биологических эффектах патогенной мутации и известных механизмах действия препарата-кандидата. Правильные диетические мероприятия у некоторых пациентов с метаболическими нарушениями могут быть введены после обнаружения конкретной мутации. Zhou и др. нашли четыре примера, когда генетический диагноз привел к корректировке терапии. Для двух пациентов генетический диагноз оказался решающим для введения нового эффективного препарата. Один из пациентов имел de novo миссенс-мутацию в гене *KCNQ2* и получал ретигабин, а другой пациент имел de novo миссенс-мутацию в *KCNT1* и получал лечение хинидином. Хинидин рассматривался в качестве возможной терапии судорог при *KCNQ2*-ассоциированной эпилептической энцефалопатии только после выявления генотипа *KCNT1*. Таким образом, данные диагностики, полученные в результате применения NGS технологий, могут лежать в основе персонализированного подхода к лечению пациентов.

Основные показания для полногеномного секвенирования

Значимые технологические достижения и снижение стоимости секвенирования ДНК делают возможным рассматривать секвенирование всего генома в качестве доступного диагностического теста по многочисленным показаниям. Тем не менее широкое использование WGS в рутинной клинической практике пока еще остается не близкой перспективой. Необходимо проведение исследований по оценке преимуществ WGS в обеспечении качества диагностики, оценки рисков гипердиагностики, решение проблем интерпретации результатов, решение этических проблем.

В настоящее время для сокращения «диагностической одиссеи» в случае с генными заболеваниями рекомендуется проведение полногеномного секвенирования в следующих ситуациях:

1. В случае наследственных заболеваний, для которых характерна выраженная генетическая гетерогенность. Как показано, именно генетическая гетерогенность является наиболее частой причиной невозможности поставить диагноз до проведения полногеномного секвенирования. Кроме того, учитывая разнообразие клинических проявлений, связанных с генетической гетерогенностью, метод WGS будет иметь значительные преимущества, поскольку обеспечивает комплексный подход.
2. При дифференциальной диагностике синдромов, которые клинически проявляются схожей или перекрывающейся симптоматикой.
3. В случае неспецифических фенотипических проявлений или неопределенной фенотипической картины, когда на клиническом уровне невозможно сформулировать диагностическую гипотезу. В этом случае чаще всего показаниями для проведения полногеномного секвенирования являются врожденные пороки развития, признаки дизморфогенеза, нарушение умственного развития, расстройства аутистического спектра, эпилепсия, неврологические нарушения, встречающиеся как изолированно, так и в сочетании.

4. В случае необычных проявлений или смешанной клинической картины у пациента, включающей симптомы двух или более известных редких заболеваний, а также наличия в семье нескольких больных с различающимися фенотипами. Показано, что около 5% пациентов имеют смешанные клинические проявления в результате наличия мутаций двух различных генов, т.е. имеют два наследственных заболевания. Очевидно, что фенотипический анализ таких случаев является сложной задачей, которая может быть решена только с помощью современных лабораторных методов генетического анализа. Предполагается, что число случаев, при которых у одного больного с помощью WGS выявляется два различных заболевания, будет расти по мере расширения использования метода массового параллельного секвенирования.
5. В случае, когда фенотип пациента и/или семейный анамнез указывают на моногенное заболевание, однако, тестирование предполагаемого каузативного гена дало отрицательный результат и диагноз не был установлен.

Контрольные вопросы и задания:

1. Почему полногеномное секвенирование является предпочтительным методом диагностики состояний с эпилепсией?
2. Какие синдромы относятся к цилиопатиям и какой диагностический метод для них более предпочтителен?
3. Каковы основные задачи WGS при кардиомиопатиях?
4. Каков диагностический алгоритм для фенотипов с умственной отсталостью и/или аутизмом?
5. Какова доля точечных и indel мутаций для тяжелых форм врожденных пороков сердца?

6. В каких случаях можно предполагать генетическую этиологию дизморфологических нарушений?
7. Что такое обратная дизморфология?
8. На сколько вырос уровень детекции каузативных мутаций при нарушениях слуха и зрения при применении WES/WGS?
9. Какова стратегия генетического обследования при недиагностированных заболеваниях?
10. Перечислите основные показания для полногеномного секвенирования?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Расшифровка генома человека и появление высокопроизводительного параллельного секвенирования (NGS) привели к тому, что последовательность ДНК любого пациента может быть быстро и точно определена, и возможные генетические причины заболевания могут быть выявлены.

В этой связи в исследовательской и клинической практике все активнее применяется полногеномное секвенирование (WGS) на основе NGS технологий. Высокую диагностическую ценность WGS имеет при диагностике моногенных заболеваний. Показано, что секвенирование всего генома позволяет поставить диагнозы наследственного заболевания у 25% пациентов. Это важно, поскольку при быстрой и эффективной диагностике пациенты могут получать адекватную и своевременную медицинскую помощь. Применение полногеномного секвенирования обеспечивает диагностику редких заболеваний на более ранних стадиях, что повышает эффективность лечения, предотвращение прогрессирования заболевания, если это возможно. Кроме того, полногеномное секвенирование можно использовать в качестве прогностического теста для оценки того, унаследовали ли это редкое заболевание другие члены семьи. Все это указывает на необходимость более широкого внедрения WGS в клинику, чтобы в конечном счете в полной мере использовать его потенциальные возможности для улучшения здоровья пациентов.

Полногеномное секвенирование важно не только для установления диагноза, но и служит основной для понимания патогенетических механизмов заболеваний, выделения новых нозологий, эффективного генетического консультирования пациентов, пренатальной диагностики и разработки подходов к таргетному лечению.

Во многих исследованиях подчеркивается влияние NGS технологий, включая полногеномное секвенирование, на уровень научных знаний. С одной стороны, с помощью новых технологий выявляются новые гены как причины

заболеваний. С другой стороны, выявляется связь новых фенотипов с ранее описанными генами. Оценивая влияние NGS, становится ясным, что ранее описанные генетические нарушения имеют более широкий спектр фенотипических проявлений, чем предполагалось ранее.

Однако бурное развитие и применение технологии NGS закономерно создает и проблемы. В частности, необходимо научно осмыслять растущий поток информации, получаемый в результате расшифровки геномов. Использование технологий геномного секвенирования выявило большую изменчивость геномов в человеческой популяции. В этой связи большое значение приобретает процесс идентификации и оценки значимости выявляемых вариантов или биоинформатический анализ.

Технологическое совершенствование диагностических методов актуализирует и необходимость совершенствования практических врачебных навыков в работе с полученной в результате секвенирования информацией, сборе анамнеза, описании фенотипических проявлений и сопоставлении их с данными о геноме пациента.

В пособии рассмотрены многочисленные примеры применения современных геномных технологий в разных областях медицины: неврологии, кардиологии, дизморфологии, нарушениях слуха и зрения. На основании рассмотренных примеров можно сказать, что технологии NGS оказывают все большее влияние на развитие нейрогенетики, кардиогенетики, офтальмогенетики и других направлений медицины.

Прогнозируется, что в дальнейшем производительность секвенирования будет повышаться, а его себестоимость будет снижаться. Это позволит еще шире внедрять технологию в клиническую практику, сокращая время «диагностической одиссеи» и улучшая ее результаты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная:

1. Кокорина О.С., Сагайдак О.В., Баранова Е.Е., Зобкова Г.Ю., Беленикин М.С., Грознова О.С., Меликян Л.П., Шидловская О.А.. Ранняя диагностика прогрессирующей диафизарной дисплазии (болезнь Камурати–Энгельмана): выявление каузативной мутации при полногеномном секвенировании. Педиатрия им. Г.Н. Сперанского. 2022; 101 (5): 168–172. DOI: 10.24110/0031-403X2022-101-5-168-172.

2. Наумова О.Ю., Добрынин П. В., Гибитова Е. А., Жукова М. А., Рычков С. Ю., Жукова О. В., Григоренко Е. Л. Идентификация патогенных CNV с помощью экзомного секвенирования при необъясненных задержках развития: исследование семейного трио // Генетика. - 2021. - №11. - С. 1333-1338.

3. Новикова Е.И., Снигирева Г.П. Секвенирование «Нового поколения» (NGS): применение для молекулярно-генетических исследований в онкологии // Вестник РНЦРР. 2016. №1. URL: https://cyberleninka.ru/article/n/sekvenirovanie-novogo-pokoleniya-ngs-primenenie-dlya-molekulyarno-geneticheskih-issledovaniy-v-onkologii (дата обращения: 13.11.2022).

4. NGS. Высокопроизводительное секвенирование [Текст] / [Д. В. Ребриков и др.] ; под ред. Д. В. Ребрикова. - Москва : БИНОМ. Лаб. знаний, 2014. - 232 с.

5.Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б., Коновалов Ф.А., Масленников А.Б., Степанов В.А., Афанасьев А.А., Заклязьминская Е.В., Ребриков Д.В., Савостьянов К.В., Глотов А.С., Костарева А.А., Павлов А.Е., Голубенко М.В., Поляков А.В., Куцев С.И. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2). Медицинская генетика. 2019;18(2):3-23. https://doi.org/10.25557/2073-7998.2019.02.3-23

6. Шестак А.Г. Глоссарий основных элементов медико-генетических знаний: краткое пособие для пациентов и врачей не медико-генетического профиля

[электронный ресурс] / науч. ред. и автор предисл. Румянцева В.А. М., 2021. 45 с. URL: https://iphras.ru/uplfile/humexp/biblio/glossary_medgen_21.pdf

Дополнительная:

7. Aziz N, Zhao Q, Bry L, Driscoll DK, Funke B, Gibson JS, Grody WW, Hegde MR, Hoeltge GA, Leonard DG, Merker JD, Nagarajan R, Palicki LA, Robetorye RS, Schrijver I, Weck KE, Voelkerding KV. College of American Pathologists' laboratory standards for next-generation sequencing clinical tests. Arch Pathol Lab Med. 2015 Apr;139(4):481-93. doi: 10.5858/arpa.2014-0250-CP. Epub 2014 Aug 25. PMID: 25152313.

8. Barsan V, Paul M, Gorsi H, Malicki D, Elster J, Kuo DJ, Crawford J. Clinical Impact of Next-generation Sequencing in Pediatric Neuro-Oncology Patients: A Single-institutional Experience. Cureus. 2019 Dec 3;11(12):e6281. doi: 10.7759/cureus.6281. PMID: 31827999; PMCID: PMC6892579.

9. Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? Arch Dis Child Educ Pract Ed. 2013 Dec;98(6):236-8. doi: 10.1136/archdischild-2013-304340. Epub 2013 Aug 28. PMID: 23986538; PMCID: PMC3841808.

10. Carvill GL, Weckhuysen S, McMahon JM, Hartmann C, Møller RS, Hjalgrim H, Cook J, Geraghty E, O'Roak BJ, Petrou S, Clarke A, Gill D, Sadleir LG, Muhle H, von Spiczak S, Nikanorova M, Hodgson BL, Gazina EV, Suls A, Shendure J, Dibbens LM, De Jonghe P, Helbig I, Berkovic SF, Scheffer IE, Mefford HC. GABRA1 and STXBP1: novel genetic causes of Dravet syndrome. Neurology. 2014 Apr 8;82(14):1245-53. doi: 10.1212/WNL.0000000000000291. Epub 2014 Mar 12. PMID: 24623842; PMCID: PMC4001207.

11. Demkow, U. & Ploski, Rafal. Clinical Applications for Next-Generation Sequencing. 2015.

12. Dewey FE, Grove ME, Pan C, Goldstein BA, Bernstein JA, Chaib H, Merker JD, Goldfeder RL, Enns GM, David SP, Pakdaman N, Ormond KE, Caleshu C,

Kingham K, Klein TE, Whirl-Carrillo M, Sakamoto K, Wheeler MT, Butte AJ, Ford JM, Boxer L, Ioannidis JP, Yeung AC, Altman RB, Assimes TL, Snyder M, Ashley EA, Quertermous T. Clinical interpretation and implications of whole-genome sequencing. JAMA. 2014 Mar 12;311(10):1035-45. doi: 10.1001/jama.2014.1717. PMID: 24618965; PMCID: PMC4119063.

13. Fernández-Marmiesse, A., Morey, M., Pineda, M. et al. Assessment of a targeted resequencing assay as a support tool in the diagnosis of lysosomal storage disorders. Orphanet J Rare Dis 9, 59 (2014). https://doi.org/10.1186/1750-1172-9-59.

14. French CE, Dolling H, Mégy K, Sanchis-Juan A, Kumar A, Delon I, Wakeling M, Mallin L, Agrawal S, Austin T, Walston F, Park SM, Parker A, Piyasena C, Bradbury K; Next Generation Children's Project Consortium, Ellard S, Rowitch DH, Raymond FL. Refinements and considerations for trio whole-genome sequence analysis when investigating Mendelian diseases presenting in early childhood. HGG Adv. 2022 Apr 25;3(3):100113. doi: 10.1016/j.xhgg.2022.100113. PMID: 35586607; PMCID: PMC9108978.

15. Gilissen C, Hehir-Kwa JY, Thung DT, van de Vorst M, van Bon BW, Willemsen MH, Kwint M, Janssen IM, Hoischen A, Schenck A, Leach R, Klein R, Tearle R, Bo T, Pfundt R, Yntema HG, de Vries BB, Kleefstra T, Brunner HG, Vissers LE, Veltman JA. Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. Nature. 2014 Jul 17;511(7509):344-7. doi: 10.1038/nature13394. Epub 2014 Jun 4. PMID: 24896178.

16. Han J.Y., Lee I.G. Genetic tests by next-generation sequencing in children with developmental delay and/or intellectual disability // Clin. Exp. Pediatr. 2020. V. 63. № 6. P. 195–202. htt ps://doi.org/10.3345/kjp.2 019.0080

17. Jin Y, Zhang L, Ning B, et al. Application of genome analysis strategies in the clinical testing for pediatric diseases. Pediatr Invest. 2018;2:72-81.

18. Knies K, Schuster B, Ameziane N, Rooimans M, Bettecken T, de Winter J, Schindler D. Genotyping of fanconi anemia patients by whole exome sequencing: advantages and challenges. PLoS One. 2012;7(12):e52648. doi: 10.1371/journal.pone.0052648. Epub 2012 Dec 20. PMID: 23285130; PMCID: PMC3527584.

19. Lee H, Deignan JL, Dorrani N, Strom SP, Kantarci S, Quintero-Rivera F, Das K, Toy T, Harry B, Yourshaw M, Fox M, Fogel BL, Martinez-Agosto JA, Wong DA, Chang VY, Shieh PB, Palmer CG, Dipple KM, Grody WW, Vilain E, Nelson SF. Clinical exome sequencing for genetic identification of rare Mendelian disorders. JAMA. 2014 Nov 12;312(18):1880-7. doi: 10.1001/jama.2014.14604. PMID: 25326637; PMCID: PMC4278636.

20. Lionel AC, Costain G, Monfared N, Walker S, Reuter MS, Hosseini SM, Thiruvahindrapuram B, Merico D, Jobling R, Nalpathamkalam T, Pellecchia G, Sung WWL, Wang Z, Bikangaga P, Boelman C, Carter MT, Cordeiro D, Cytrynbaum C, Dell SD, Dhir P, Dowling JJ, Heon E, Hewson S, Hiraki L, Inbar-Feigenberg M, Klatt R, Kronick J, Laxer RM, Licht C, MacDonald H, Mercimek-Andrews S, Mendoza-Londono R, Piscione T, Schneider R, Schulze A, Silverman E, Siriwardena K, Snead OC, Sondheimer N, Sutherland J, Vincent A, Wasserman JD, Weksberg R, Shuman C, Carew C, Szego MJ, Hayeems RZ, Basran R, Stavropoulos DJ, Ray PN, Bowdin S, Meyn MS, Cohn RD, Scherer SW, Marshall CR. Improved diagnostic yield compared with targeted gene sequencing panels suggests a role for whole-genome sequencing as a first-tier genetic test. Genet Med. 2018 Apr;20(4):435-443. doi: 10.1038/gim.2017.119. Epub 2017 Aug 3. PMID: 28771251; PMCID: PMC5895460.

21. Matthijs G, Souche E, Alders M, Corveleyn A, Eck S, Feenstra I, Race V, Sistermans E, Sturm M, Weiss M, Yntema H, Bakker E, Scheffer H, Bauer P; EuroGentest; European Society of Human Genetics. Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. Eur J Hum Genet. 2016 Jan; 24(1):2-5. doi:

10.1038/ejhg.2015.226. Epub 2015 Oct 28. Erratum in: Eur J Hum Genet. 2016 Oct;24(10):1515. PMID: 26508566; PMCID: PMC4795226.

22. Miriam S. Reuter, Rajiv R. Chaturvedi, Eriskay Liston, Roozbeh Manshaei et al. The Cardiac Genome Clinic: implementing genome sequencing in pediatric heart disease. Genetics in Medicine. 2020; 22: 1015–1024; https://doi.org/10.1038/s41436-020-0757-x

23. Need AC, Shashi V, Hitomi Y, Schoch K, Shianna KV, McDonald MT, Meisler MH, Goldstein DB. Clinical application of exome sequencing in undiagnosed genetic conditions. J Med Genet. 2012 Jun; 49(6):353-61. doi: 10.1136/jmedgenet-2012-100819. Epub 2012 May 11. PMID: 22581936; PMCID: PMC3375064.

24. Neveling K, Collin RW, Gilissen C, van Huet RA, Visser L, Kwint MP, Gijsen SJ, Zonneveld MN, Wieskamp N, de Ligt J, Siemiatkowska AM, Hoefsloot LH, Buckley MF, Kellner U, Branham KE, den Hollander AI, Hoischen A, Hoyng C, Klevering BJ, van den Born LI, Veltman JA, Cremers FP, Scheffer H. Next-generation genetic testing for retinitis pigmentosa. Hum Mutat. 2012 Jun;33(6):963-72. doi: 10.1002/humu.22045. Epub 2012 Mar 19. Erratum in: Hum Mutat. 2013 Aug;34(8):1181. PMID: 22334370; PMCID: PMC3490376.

25. Neveling K, Feenstra I, Gilissen C, Hoefsloot LH, Kamsteeg EJ, Mensenkamp AR, Rodenburg RJ, Yntema HG, Spruijt L, Vermeer S, Rinne T, van Gassen KL, Bodmer D, Lugtenberg D, de Reuver R, Buijsman W, Derks RC, Wieskamp N, van den Heuvel B, Ligtenberg MJ, Kremer H, Koolen DA, van de Warrenburg BP, Cremers FP, Marcelis CL, Smeitink JA, Wortmann SB, van Zelst-Stams WA, Veltman JA, Brunner HG, Scheffer H, Nelen MR. A post-hoc comparison of the utility of sanger sequencing and exome sequencing for the diagnosis of heterogeneous diseases. Hum Mutat. 2013 Dec;34(12):1721-6. doi: 10.1002/humu.22450. Epub 2013 Oct 18. PMID: 24123792.

26. Nishri D, Edvardson S, Lev D, Leshinsky-Silver E, Ben-Sira L, Henneke M, Lerman-Sagie T, Blumkin L. Diagnosis by whole exome sequencing of atypical

infantile onset Alexander disease masquerading as a mitochondrial disorder. Eur J Paediatr Neurol. 2014 Jul;18(4):495-501. doi: 10.1016/j.ejpn.2014.03.009. Epub 2014 Apr 8. PMID: 24742911.

27. Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, Berg JS, Brown KK, Deignan JL, Friez MJ, Funke BH, Hegde MR, Lyon E; Working Group of the American College of Medical Genetics and Genomics Laboratory Quality Assurance Commitee. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. Genet Med. 2013 Sep;15(9):733-47. doi: 10.1038/gim.2013.92. Epub 2013 Jul 25. PMID: 23887774; PMCID: PMC4098820.

28. Rios J, Stein E, Shendure J, Hobbs H, and Cohen J. Identification by whole-genome resequencing of gene defect responsible for severe hypercholesterolemia. Hum Mol Genet, 2010, Vol. 19 (22), 4313–4318. doi:10.1093/hmg/ddq352

29. Richards, S., Aziz, N., Bale, S. *et al.* Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med. 2015, 17, 405–423. https://doi.org/10.1038/gim.2015.30.

30. Salzberg, S.L. Open questions: How many genes do we have?. BMC Biol 16, 94 (2018). https://doi.org/10.1186/s12915-018-0564-x

31. Shearer AE, DeLuca AP, Hildebrand MS, Taylor KR, Gurrola J 2nd, Scherer S, Scheetz TE, Smith RJ. Comprehensive genetic testing for hereditary hearing loss using massively parallel sequencing. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Dec 7;107(49):21104-9. doi: 10.1073/pnas.1012989107. Epub 2010 Nov 15. PMID: 21078986; PMCID: PMC3000272.

32. Shearer AE, Kolbe DL, Azaiez H, Sloan CM, Frees KL, Weaver AE, Clark ET, Nishimura CJ, Black-Ziegelbein EA, Smith RJ. Copy number variants are a common cause of non-syndromic hearing loss. Genome Med. 2014 May 22;6(5):37. doi: 10.1186/gm554. PMID: 24963352; PMCID: PMC4067994.

33. Yang Y, Muzny DM, Reid JG, Bainbridge MN, Willis A, Ward PA, Braxton A, Beuten J, Xia F, Niu Z, Hardison M, Person R, Bekheirnia MR, Leduc MS, Kirby A, Pham P, Scull J, Wang M, Ding Y, Plon SE, Lupski JR, Beaudet AL, Gibbs RA, Eng CM. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. N Engl J Med. 2013 Oct 17;369(16):1502-11. doi: 10.1056/NEJMoa1306555. Epub 2013 Oct 2. PMID: 24088041; PMCID: PMC4211433.

34. Zhou SF, Di YM, Chan E, Du YM, Chow VD, Xue CC, Lai X, Wang JC, Li CG, Tian M, Duan W. Clinical pharmacogenetics and potential application in personalized medicine. Curr Drug Metab. 2008 Oct;9(8):738-84. doi: 10.2174/138920008786049302. PMID: 18855611.

35. Zhu, FY., Chen, MX., Ye, NH. et al. Comparative performance of the BGISEQ-500 and Illumina HiSeq4000 sequencing platforms for transcriptome analysis in plants. Plant Methods 14, 69 (2018). https://doi.org/10.1186/s13007-018-0337-0

36. Zhu X, Petrovski S, Xie P, Ruzzo EK, Lu YF, McSweeney KM, Ben-Zeev B, Nissenkorn A, Anikster Y, Oz-Levi D, Dhindsa RS, Hitomi Y, Schoch K, Spillmann RC, Heimer G, Marek-Yagel D, Tzadok M, Han Y, Worley G, Goldstein J, Jiang YH, Lancet D, Pras E, Shashi V, McHale D, Need AC, Goldstein DB. Whole-exome sequencing in undiagnosed genetic diseases: interpreting 119 trios. Genet Med. 2015 Oct;17(10):774-81. doi: 10.1038/gim.2014.191. Epub 2015 Jan 15. PMID: 25590979; PMCID: PMC4791490.

37. Онлайн-ресурс «менделевское наследование у человека» https://www.omim.org/

38. Онлайн-ресурс Gene Reviews https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1116/

39. https://www.fdanews.com/ext/resources/files/2016/07/07-13-16-NGSpublicdatabase.pdf?1468420275 (дата обращения: 16.11.2022 г.)

40. https://www.fiercebiotech.com/medtech/illumina-pitches-200-genomes-new-line-dna-sequencers (дата обращения: 05.12.2022 г.)

ДЕМИКОВА Наталия Сергеевна

БАРАНОВА Елена Евгеньевна

ПОКАЗАНИЯ К ПОЛНОГЕНОМНОМУ СЕКВЕНИРОВАНИЮ У БОЛЬНЫХ С ПОДОЗРЕНИЕМ НА НАСЛЕДСТВЕННЫЕ РЕДКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Учебное пособие

Российская медицинская академия
непрерывного профессионального образования
ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России
ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1, Москва, 125993
Электронный адрес www.rmapo.ru
E-mail: rmapo@rmapo.ru