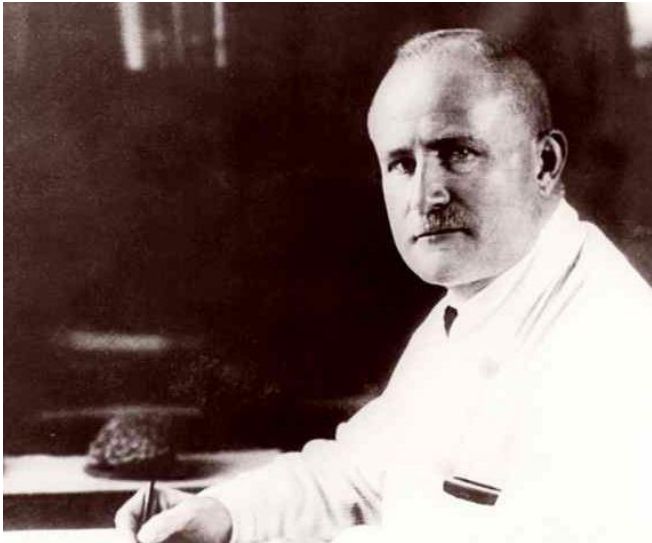
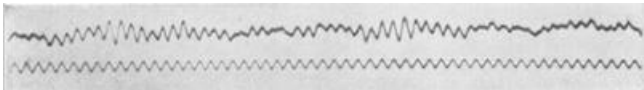


# Новые подходы к диагностике наследственных заболеваний нервной системы

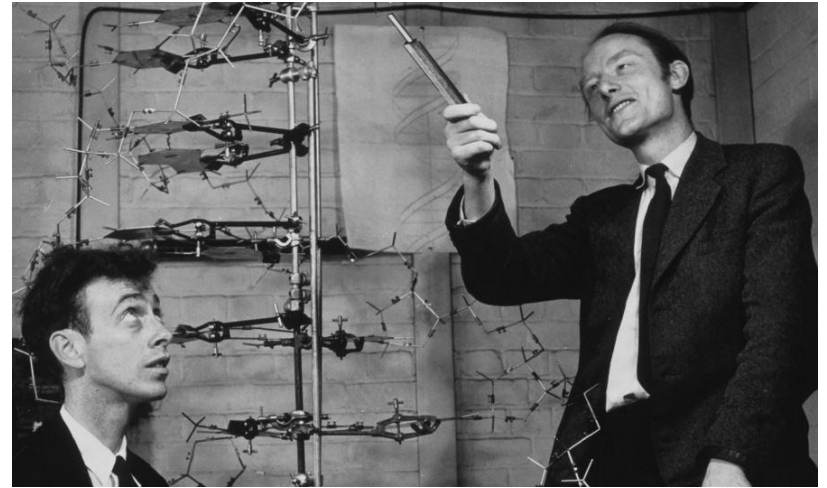
Канивец И.В.  
врач-генетик,  
руководитель отдела генетики  
Медико-генетического центра  
«Геномед»



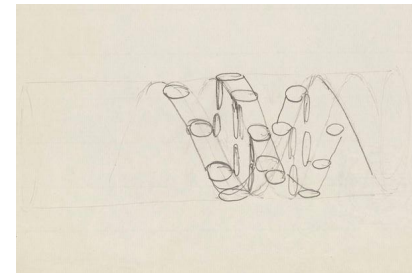
Ханс Бергер



Первая ЭЭГ человека,  
записанная в 1924 году



Джеймс Уотсон и  
Фрэнсис Крик



Эскиз двойной спирали ДНК.  
Ф. Крик, 1953

# Число генов и фенотипов (OMIM)

	Аутосомные	X-сцепленные	Y-сцепленные	Митохондриальные	Всего
Ген описан	14568	715	49	35	15367
Ген и фенотип, сочетание	78	0	0	2	80
Фенотип описан, молекулярная причина известна	4478	310	4	29	4821
Фенотип описан, молекулярная причина неизвестна	1489	124	5	0	1618
Другое (в основном фенотипы, с предполагаемым менделевским наследованием)	1680	111	2	0	1793
Итого	22293	1260	60	66	23679

# Типы наследования заболеваний нервной системы

- моногенные заболевания, подчиняющиеся менделевским закономерностям: аутосомно-рецессивные и аутосомно-доминантные;
- моногенные заболевания, наследование которых отклоняется от менделевского наследования (сцепленные с половыми хромосомами)
- мультифакториальное наследование;
- митохондриальный тип наследования (материнский, или цитоплазматический);
- импринтинг;
- хромосомные аномалии

# Эмпирические риски (на примере мультифакториальной эпилепсии)

- Риск возникновения эпилепсии у детей больного составляет 4%, что в 4 раза выше, чем в популяции в целом
- Риск возникновения эпилепсии, если больны оба родителя составляет 20-30% (высокий генетический риск)
- Риск возникновения эпилепсии у монозиготного близнеца, если другой болен - 80%
- Риск возникновения заболевания у дизиготного близнеца 10-20%

# Для чего нужна точная генетическая диагностика

- установление диагноза
- определение прогноза для пациента (продолжительность жизни, будет ли прогрессировать, возможность реабилитации)
- определение прогноза для членов семьи (возможность рождения здорового ребенка, пренатальная диагностика)
- прогноз эффективности лекарственной терапии
- прогноз эффективности хирургического лечения

# Проблемы, связанные с генетической диагностикой

- генетическая гетерогенность
- клинический полиморфизм
- неправильное представление о возможностях тех или иных методов
- отсутствие алгоритмов применения этих методов в клинической практике
- ошибки при выборе метода диагностики
- ошибки при выборе лаборатории
- ошибки при трактовке результатов исследований

# Генетическая гетерогенность

## Моногенные заболевания, обусловленные мутациями в гене *SCN1A*

- синдром Драве (OMIM: 607208)
- генерализованные эпилептические приступы с фебрильными судорогами плюс, тип 2 (OMIM: 604403)
- семейные фебрильные судороги, тип 3А (OMIM: 604403)
- семейная гемиплегическая мигрень, тип 3 (OMIM: 609634)



# Генетическая гетерогенность

## Этиология эпилептических энцефалопатий

Мутации в генах

*SCN1A*

*STXBP1*

*SPTAN1*

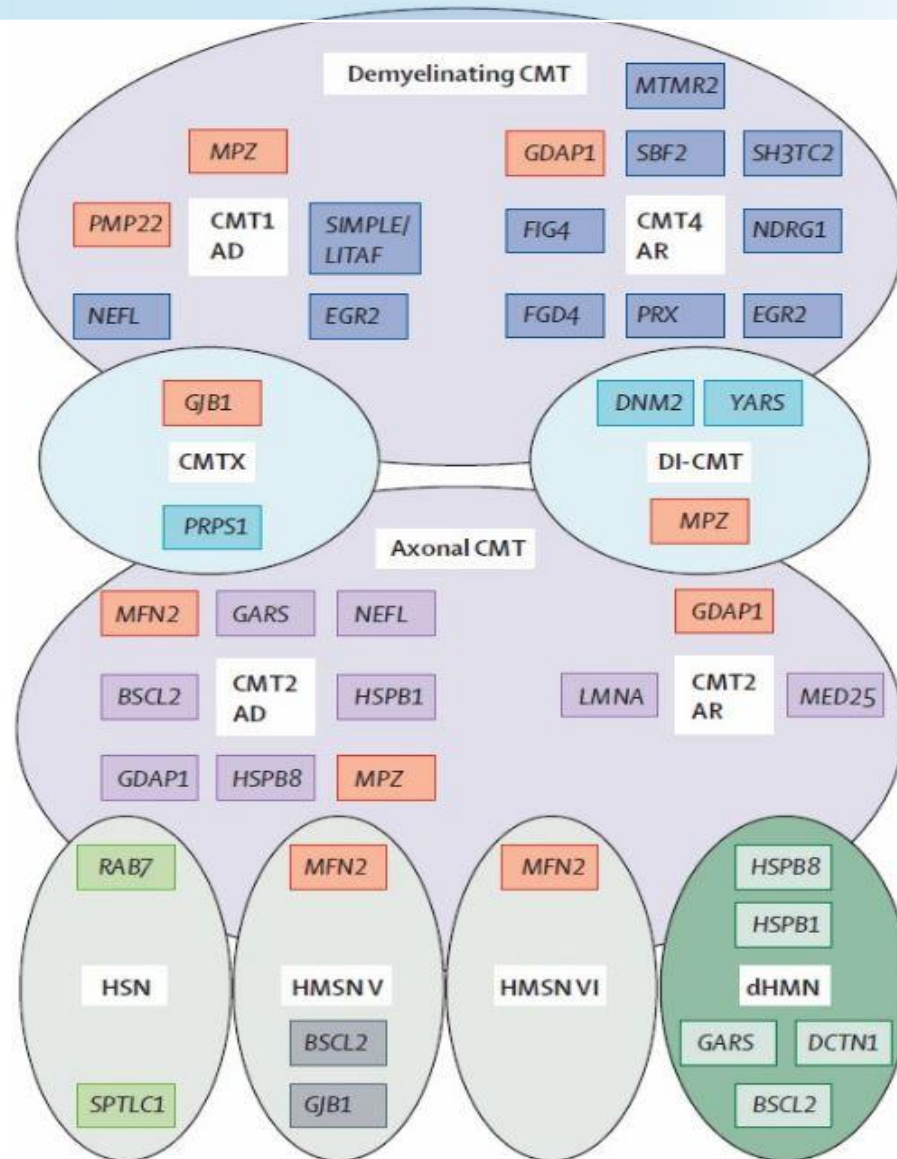
*ARX*

*CDKL5*

(большинство de novo)

Вариации числа копий (CNVs)  
у 8% пациентов

# Генетическая гетерогенность



# В основе многих алгоритмов диагностики лежат

- частота встречаемости отдельных генетических вариантов
- наличие мажорных мутаций в генах, приводящих к их возникновению
- особенности клинических проявлений

# Что мешает использовать такие алгоритмы?

- частота встречаемости генетических вариантов может различаться в отдельных популяциях
- мажорные мутации выявляются не всегда
- особенности клинических проявлений отдельных генетических вариантов выявляются не всегда



# Какой метод выбрать?

ПЦР

Таргетное  
секвенирован  
ие

ХМА

FISH

Секвенирован  
ие по Сэнгеру

TMC

MLPA

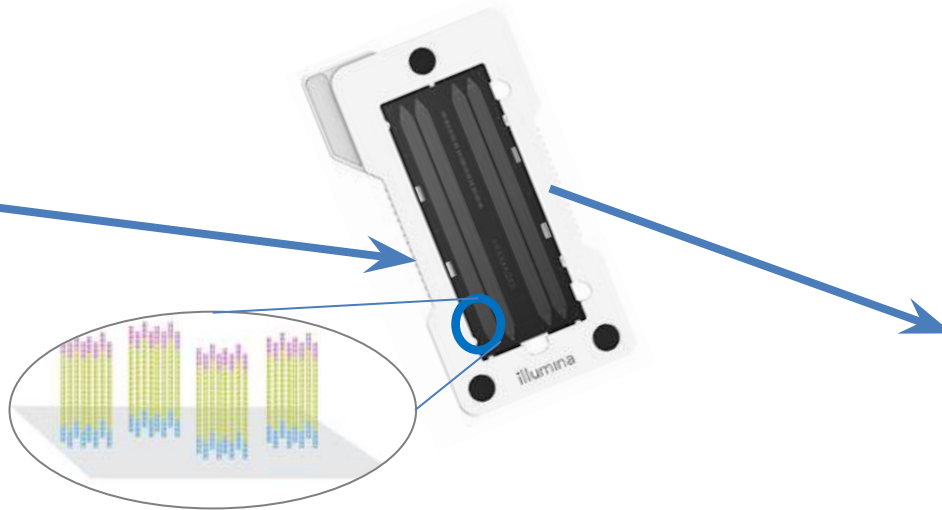
Анализ  
кариотип  
а

NGS



# Секвенирование нового поколения

**NGS представляет собой новый подход для идентификации генетической изменчивости многих генов за один прием**



Предтестовая  
консультация

Забор  
образцов

Лабораторное  
исследование

Анализ  
данных

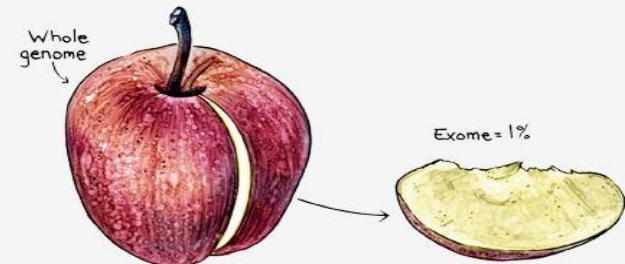
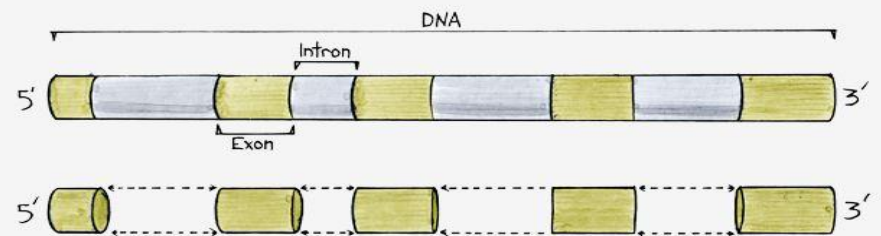
Заключение

Посттестовая  
консультация



# Секвенирование экзона

**Секвенирование экзона (Exome sequencing)** – секвенирование всех кодирующих белки участков генов (экзонов). Экзом (180000 экзонов или приблизительно 30 млн. пар оснований) составляет около 1% генома человека, но мутации в нем имеют гораздо больше шансов вызывать серьезные последствия, чем в остальных !





# Панели, клиническое экзом или полный экзом?

	Панели	Клиническое секвенирование экзома	Полное секвенирование экзома
Число генов			20000
Выявление структурных вариантов			Лучше
Выявление новых генов			Возможно
Эффективность			46%
Преимущество	Возможность включения редких генов, не входящих в КСЭ	Соотношение цена/эффективность	Анализ всех кодирующих участков
Цена	Доступная	Доступная	Доступная

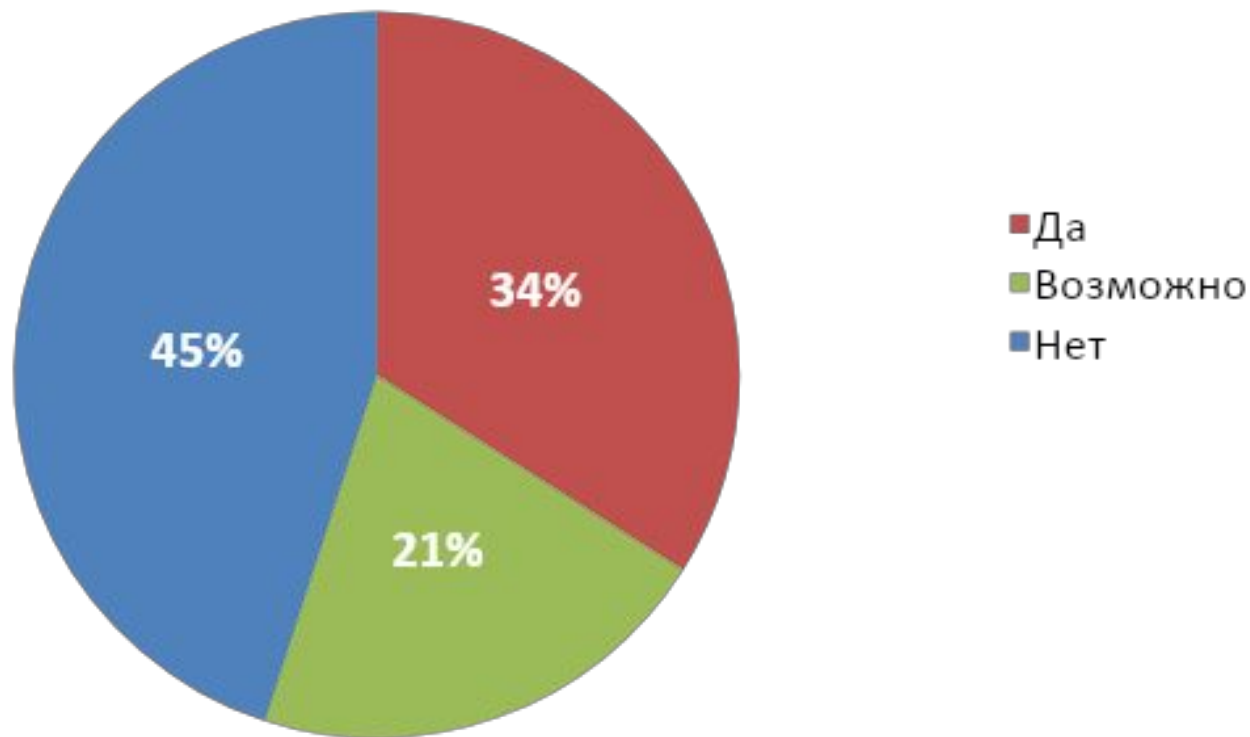
## Преимущества обследования трио:

- Идентификация новых редких мутаций
- Идентификация новых синдромов
- Более точная идентификация доминантных ранее описанных синдромов

# Панель “Наследственные эпилепсии” (560 генов)

- Ранние эпилептические энцефалопатии, фебрильные судороги, генерализованные судороги с фебрильными +, миоклонус эпилепсии, ночные лобные эпилепсии, височные эпилепсии, доброкачественные неонатальные судороги
- Болезни нарушения гликозилирования
- Лейкодистрофии и пероксисомные болезни
- 120 вариантов других болезней нарушения обмена веществ
- 40 вариантов моногенных пороков и органических патологий мозга сопровождающихся судорогами ( в том числе, кортикальная дисплазия шизенцефалия, лиссенцефалия, туберозный склероз и др.)
- 50 наследственных синдромов, сопровождающихся судорогами
- 31 вариант неспецифической УО с судорогами
- 10 нейродегенеративных заболеваний ЦНС с судорогами

# Панель “Наследственные эпилепсии”



Всего 488 пациентов с диагнозом “Эпилепсия”

# Клинический пример

- Пациент – девочка, 10 лет
- Диагноз: криптогенная фокальная эпилепсия с фебрильно-провоцируемым приступом
- Исследование генома «СНП-микроматрица»
- Результаты исследования

**ДОСТАТОЧНО ЛИ ДАННЫХ  
ДЛЯ УСТАНОВЛЕНИЯ  
ДИАГНОЗА?**

Мутация	Ген	Скрипт	Частота аллеля*
chrX:99661877_83dup7	PCDH19	020766	не описана

- Гетерозиготные мутации в гене *PCDH19* ассоциированы с ранней детской эпилептической энцефалопатией 9 (OMIM: 300088). Заболевание наследуется по X-сцепленному доминантному типу и ограничено женским полом.

# Клинический пример (продолжение)

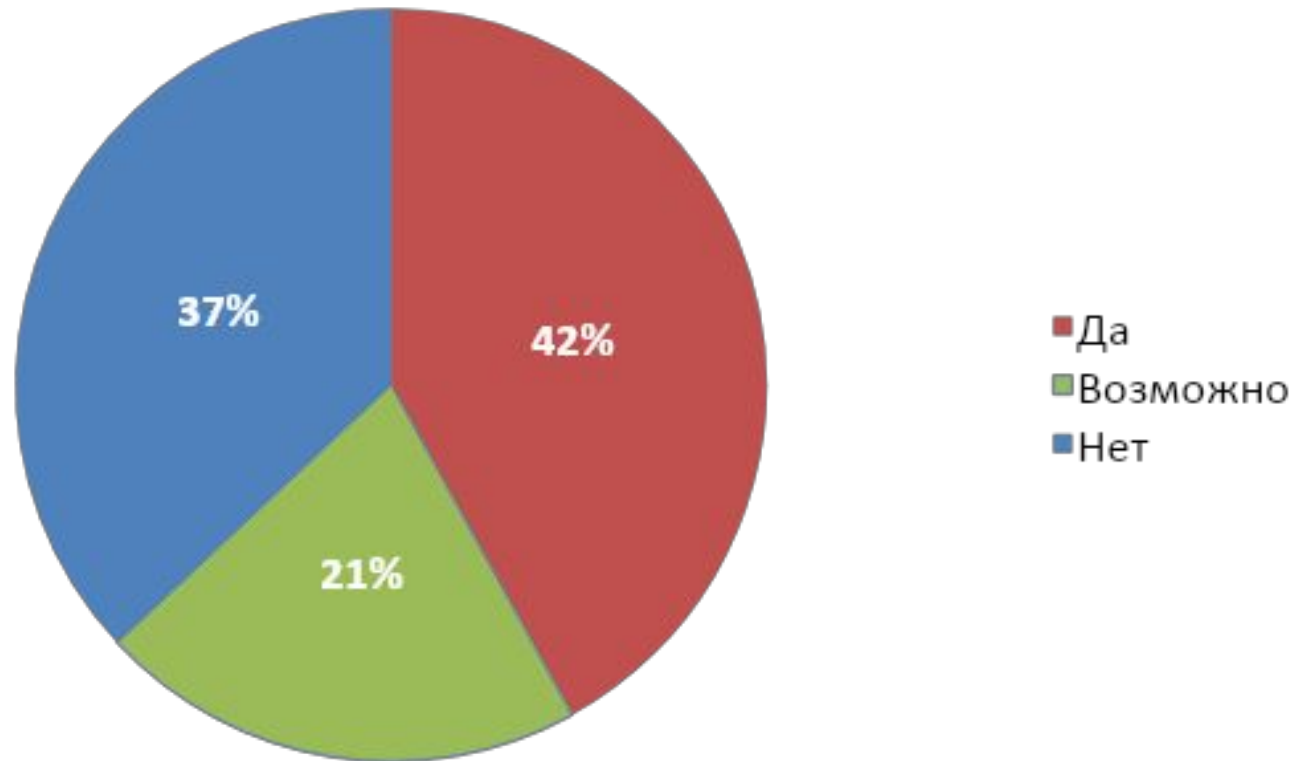
## Секвенирование по Сэнгеру (прямое секвенирование)

- Обязательно проводится до установления клинического диагноза
- Подтверждает наличие выявленного при NGS варианта у пробанда
- Позволяет установить происхождение мутации или статус de novo
- Позволяет подтвердить компаунд-гетерозиготное состояние мутации у пробанда

# Панель “Нервно-мышечные заболевания” (391 ген)

- Первично-мышечные заболевания
- Болезни мотонейрона
- Заболевания периферических нервов
- Болезни нервно-мышечных синапсов
- Метаболические миопатии
- Миотонии и периодический паралич

# Панель “Нервно-мышечные заболевания” (391 ген)



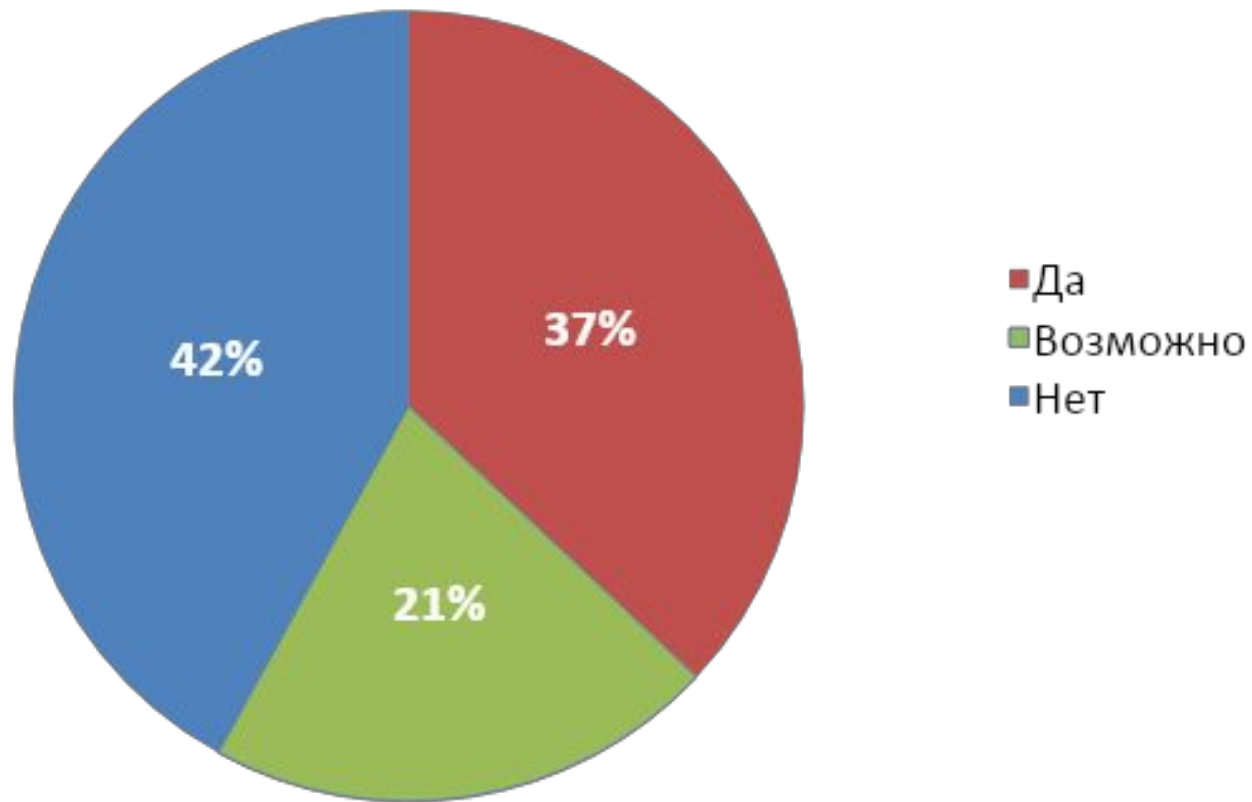
Всего 214 пациентов

# Панель “Нейродегенеративные заболевания” (723 гена)

- Деменции
- Паркинсонизм
- Атаксии
- Пароксизмальные двигательные расстройства
- Нейродегенерация, ассоциированная с накоплением металлов
- Нейрональный цероидный липофусциноз
- БАС
- Синдром исчезающего белого вещества



# Панель “Нейродегенеративные заболевания”



Всего 220  
пациентов

# Клинический пример

- Пациент К., девочка 14 лет. В 11 лет – эпилептический приступ. В настоящее время – прогрессирующая атрофия мозжечка, ЭЭГ – без эпилептической активности.
- Отсутствует ухудшение зрения

# Клинический пример (продолжение)

## Результаты секвенирования

### 1. Патогенные мутации, являющиеся вероятной причиной заболевания

Положение (hg19)	Генотип	Ген	Положение в кДНК	Замена АК	Экзон	Транскрипт	Частота аллеля*	Глубина прочтения
Не выявлено								

### 2. Вероятно патогенные мутации, являющиеся возможной причиной заболевания

Положение (hg19)	Генотип	Ген	Положение в кДНК	Замена АК	Экзон	Транскрипт	Частота аллеля*	Глубина прочтения
chr11:6640426C>T	C/T	<i>TPP1</i>	c.89+1G>A	-	инт. 2	NM_000391.3	н/д	117x

### 3. Мутации с неизвестным клиническим значением, имеющие возможное отношение к фенотипу. Для уточнения статуса патогенности таких мутаций и их отношения к заболеванию у пациента могут потребоваться дополнительные исследования.

Положение (hg19)	Генотип	Ген	Положение в кДНК	Замена АК	Экзон	Транскрипт	Частота аллеля*	Глубина прочтения
chr6:52317555C>T	C/T	<i>EFHC1</i>	c.643C>T	p.Leu215Phe	4	NM_018100.3	0.005%	122x
chr9:131340406C>G	C/G	<i>SPTAN1</i>	c.1103C>G	p.Ala368Gly	9	NM_001130438.2	н/д	54x
chr11:6638006C>G	C/G	<i>TPP1</i>	c.772G>C	p.Ala258Pro	7	NM_000391.3	н/д	135x

# Клинический пример (продолжение)

Что из найденного нужно подтвердить и как?

## 1. Патогенные мутации, являющиеся вероятной причиной заболевания

Положение (hg19)	Генотип	Ген	Положение в кДНК	Замена АК	Экзон	Транскрипт	Частота аллеля*	Глубина прочтения
Не выявлено								

## 2. Вероятно патогенные мутации, являющиеся возможной причиной заболевания

Положение (hg19)	Генотип	Ген	Положение в кДНК	Замена АК	Экзон	Транскрипт	Частота аллеля*	Глубина прочтения
chr11:6640426C>T	C/T	TPP1	c.89+1G>A	-	инт. 2	NM_000391.3	н/д	117х

## 3. Мутации с неизвестным клиническим значением, имеющие возможное отношение к фенотипу. Для уточнения статуса патогенности таких мутаций и их отношения к заболеванию у пациента могут потребоваться дополнительные исследования.

Положение (hg19)	Генотип	Ген	Положение в кДНК	Замена АК	Экзон	Транскрипт	Частота аллеля*	Глубина прочтения
chr6:52317555C>T	C/T	EFHC1	c.643C>T	p.Leu215Phe	4	NM_018100.3	0.005%	122х
chr9:131340406C>G	C/G	SPTAN1	c.1103C>G	p.Ala368Gly	9	NM_001130438.2	н/д	54х
chr11:6638006C>G	C/G	TPP1	c.772G>C	p.Ala258Pro	7	NM_000391.3	н/д	135х

# Клинический пример (продолжение)

И что на самом деле мы хотим подтвердить?

RESEARCH ARTICLE

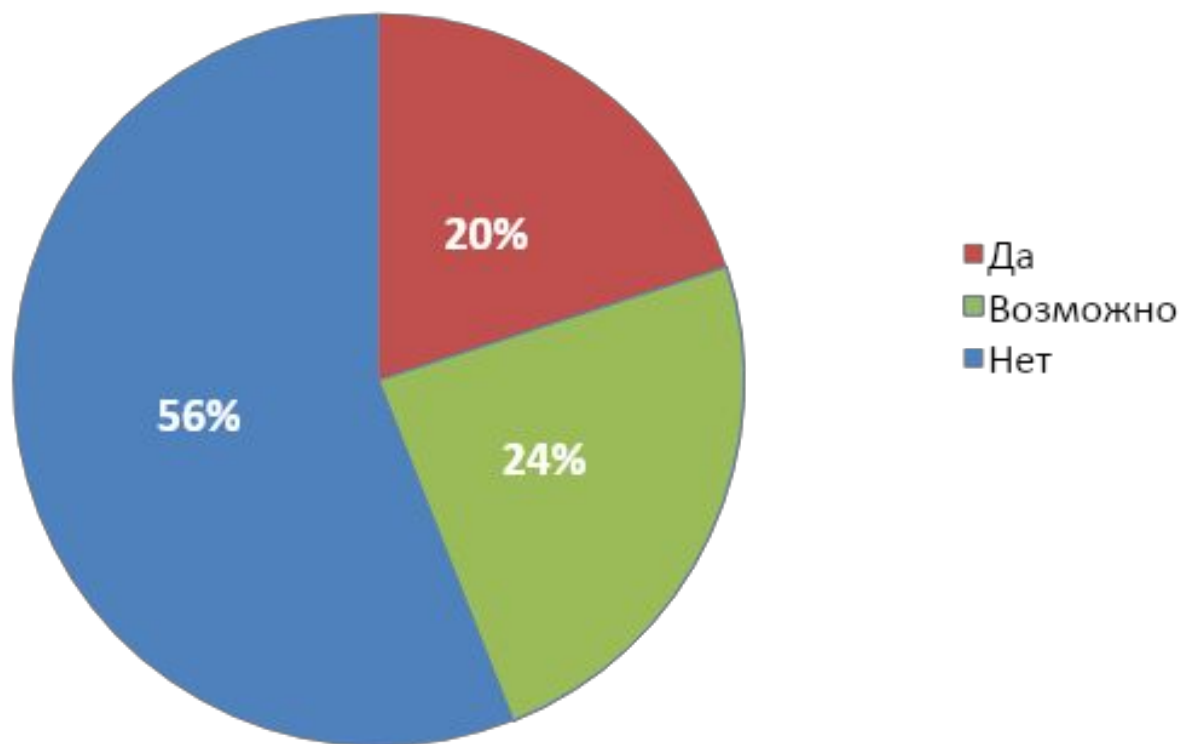
Human Mutation

**Autosomal Recessive Spinocerebellar Ataxia 7 (SCAR7) is Caused by Variants in *TPP1*, The Gene Involved in Classic Late-Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis 2 Disease (CLN2 Disease)**



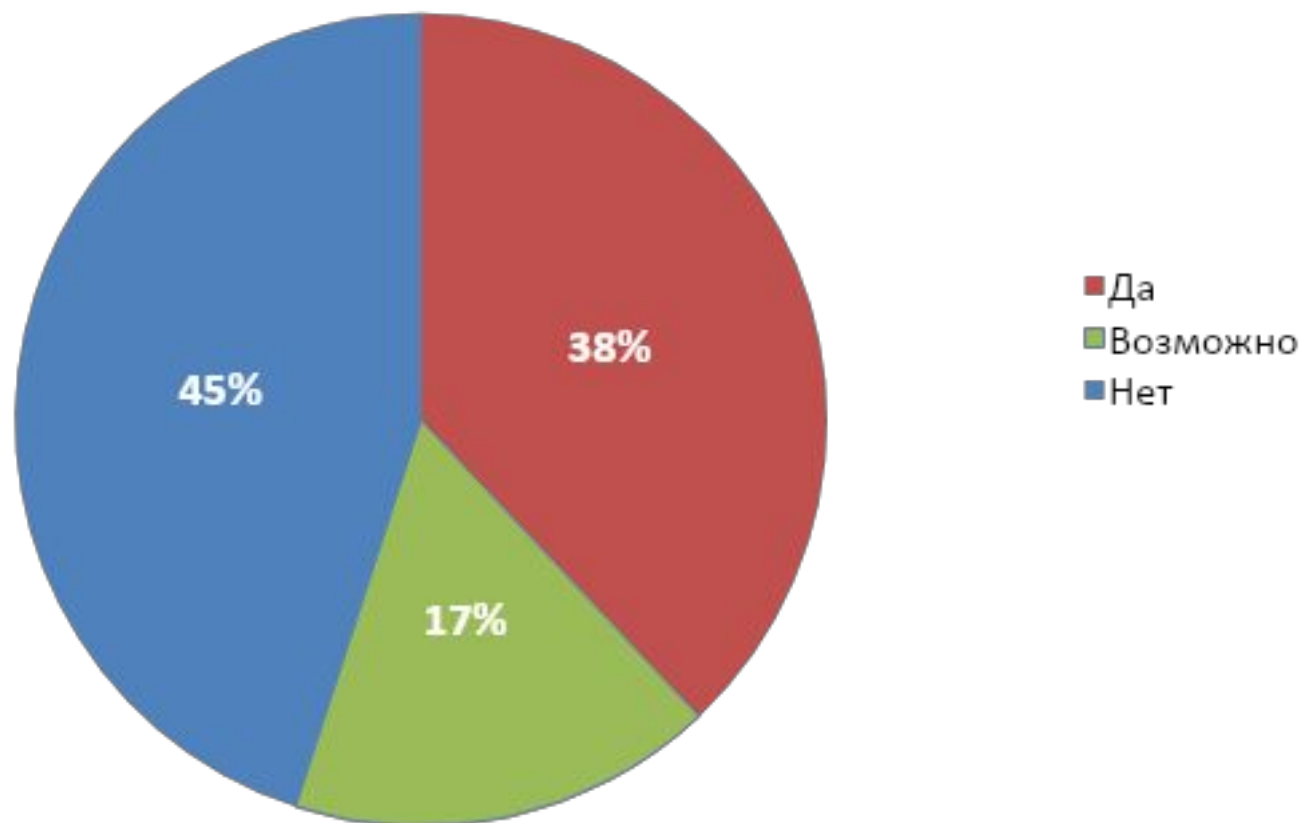
Yu Sun,<sup>1†</sup> Rowida Almomani,<sup>1†</sup> Guido J. Breedveld,<sup>2</sup> Gijs W.E. Santen,<sup>1</sup> Emmelien Aten,<sup>1</sup> Dirk J. Lefeber,<sup>3,4</sup> Jorrit I. Hoff,<sup>5</sup> Esther Brusse,<sup>6</sup> Frans W. Verheijen,<sup>2</sup> Rob M. Verdijk,<sup>7</sup> Marjolein Kriek,<sup>1</sup> Ben Oostra,<sup>2</sup> Martijn H. Breuning,<sup>1\*</sup> Monique Losekoot,<sup>1</sup> Johan T. den Dunnen,<sup>1</sup> Bart P. van de Warrenburg,<sup>3</sup> and Anneke J.A. Maat-Kievit<sup>2\*</sup>

# Панель “Умственная отсталость и расстройства аутистического спектра” (228 генов)



Всего 95  
пациентов

## Эффективность тестов на основе NGS у 1623 пациентов с подозрением на моногенную патологию



# Ограничения метода

## Нельзя обнаружить:

- мутации, приводящие к изменению числа копий генов
- экспансию тринуклеотидных повторов
- мутации в генах митохондриального генома
- мутации в некодирующих участках (интронах)
- однородительские дисомии
- различить мутации в гене и псевдогене (например, при спинальной амиотрофии)



# Генерализованные эпилепсии раннего возраста с фебрильными судорогами +

- выделяют 9 генетических вариантов
- все продукты генов формируют структуру ионных и лиганд-зависимых каналов: натриевых и ГАМК
- манифестация заболевания с 6 мес. до 6 лет с фебрильных судорог. Затем - полиморфные судороги, которые могут быть как фебрильными, так и афебрильными
- гены всех вариантов картированы на хромосомах, однако идентифицированы только шесть
- **Таким образом эффективность секвенирования - 67%**

# Хромосомные синдромы

- Причина пороков развития различных органов и систем
- Причина умственной отсталости, психических расстройств, эпилепсии
- Часто возникают вследствие носительства сбалансированных перестроек одним из родителей
- Являются серьезной медицинской и социальной проблемой
- Могут быть выявлены во время беременности
- Очень часто остаются недиагностированными даже после консультации врача-генетика

# Диагностика хромосомных синдромов

- Хромосомные синдромы традиционно диагностировались при исследовании кариотипа с использованием дифференциальной окраски
- Частота хромосомных синдромов, выявляемых с помощью традиционных методов исследования кариотипа составляет 5-7 на 1000 новорожденных.
- **Но, на самом деле, их больше,** так как возможности человеческого глаза ограничены, следовательно не все структурные перестройки хромосом могут быть выявлены.
- Прежде всего это касается **микроделеций и микродупликаций.**



# Интерпретация данных ХМА

© American College of Medical Genetics and Genomics

**ACMG STANDARDS AND GUIDELINES**

**Genetics  
inMedicine**

## **ACMG Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: revision 2013**

Sarah T. South, PhD<sup>1,2</sup>, Charles Lee, PhD<sup>3</sup>, Allen N. Lamb, PhD<sup>1,2</sup>, Anne W. Higgins, PhD<sup>4</sup>  
and Hutton M. Kearney, PhD<sup>5</sup>; for the Working Group for the American College of Medical Genetics  
and Genomics (ACMG) Laboratory Quality Assurance Committee

Базы данных OMIM, ISCA, DECIPHER, GeneReviews, литературные данные -PubMed

**OMIM**<sup>®</sup>  
Online Mendelian Inheritance in Man<sup>®</sup>  
An Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorders  
Updated 2 November 2012

 **DECIPHER**  
GRCh37

 **GeneReviews**  
NCBI

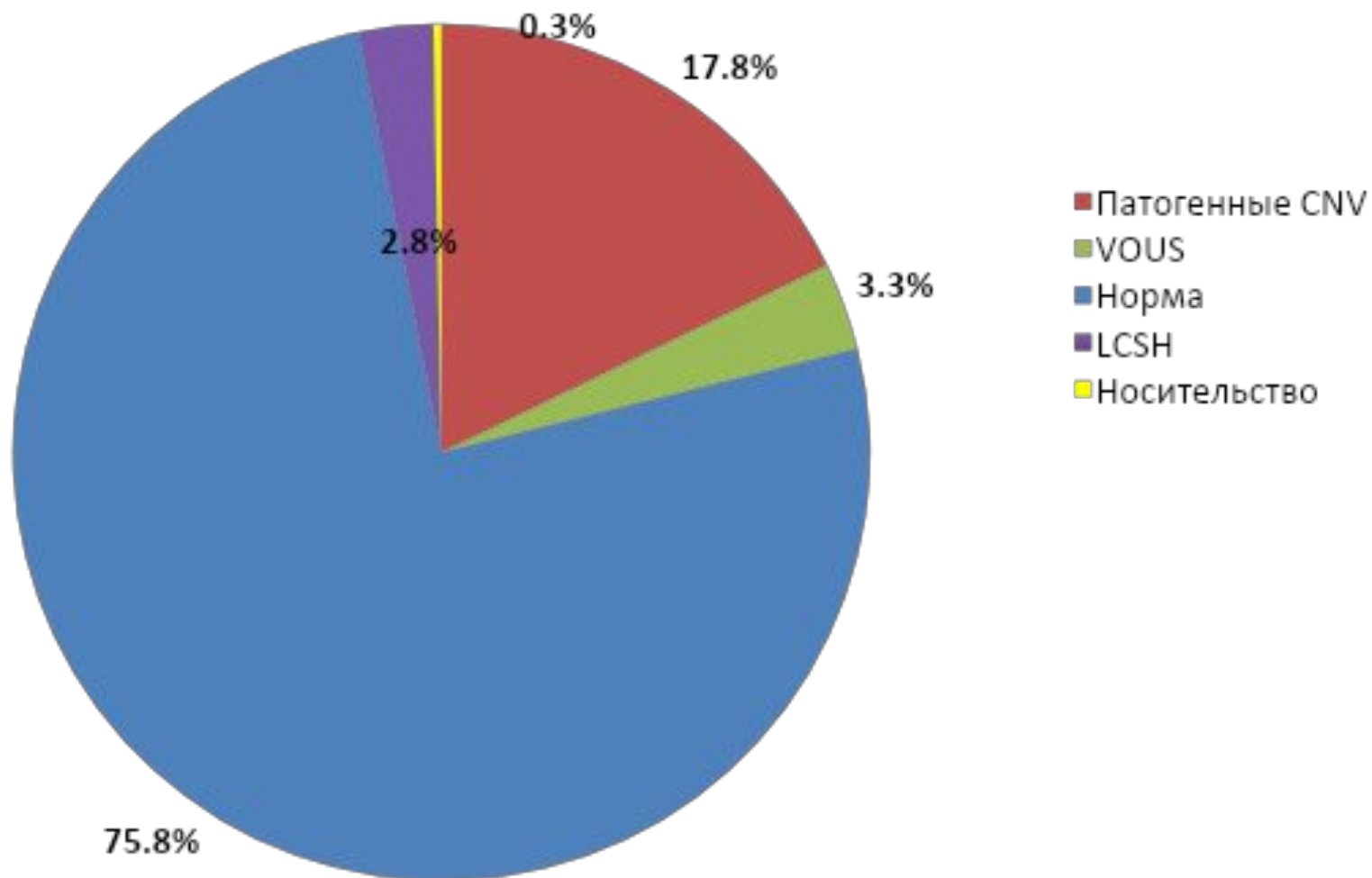
**PubMed.gov**  
US National Library of Medicine  
National Institutes of Health

**Database of Genomic Variants**

**SFARIgene**<sup>2.0</sup>

**ГЕНОМЕД**

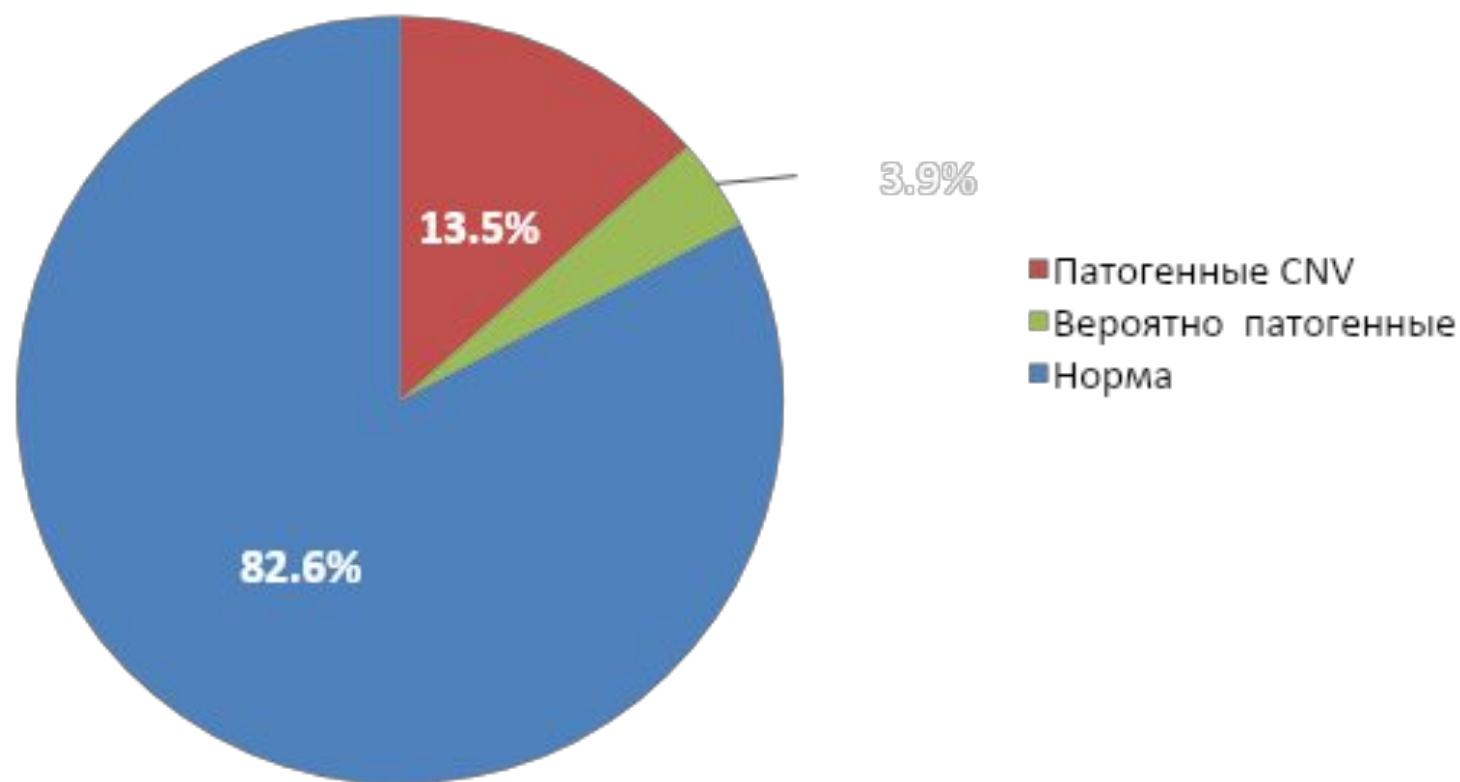
# Диагностическая эффективность ХМА



Всего 3211 пациентов

# Диагностическая эффективность ХМА

Всего обследовано 259 пациентов, в  
направительном диагнозе которых была  
указана эпилепсия



# Клинический пример

Пациент Г., мальчик, 4

г.

Клиниче

Крипто

фокаль

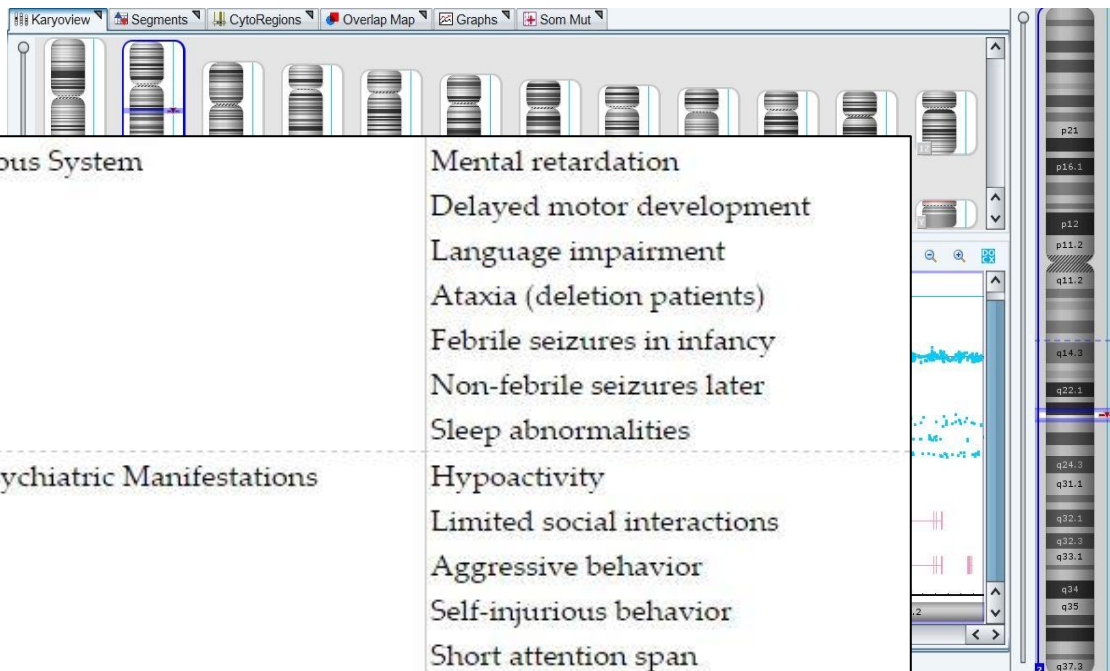
версив

вторичн

генерал

судорож

приступ



**Аутосомно-доминантная умственная отсталость, тип 1 (OMIM: 156200) обусловлена гетерозиготными делециями гена *MBD5*. У пациентов с данным синдромом описаны как фебрильные, так и афебрильные судороги.**



# Показания к проведению ХМА

**ХМА показан в качестве замены анализа кариотипа при:**

- Подозрению на микроделеционный/микродупликационный синдром
- Множественных врожденных пороках развития и/или лицевых дизморфий
- Задержке развития (моторного, психоречевого)
- Расстройствах аутистического спектра
- Эпилепсии

# НАСЛЕДСТВЕННЫЕ СИНДРОМЫ И ОСЛОЖНЕНИЯ АНЕСТЕЗИИ

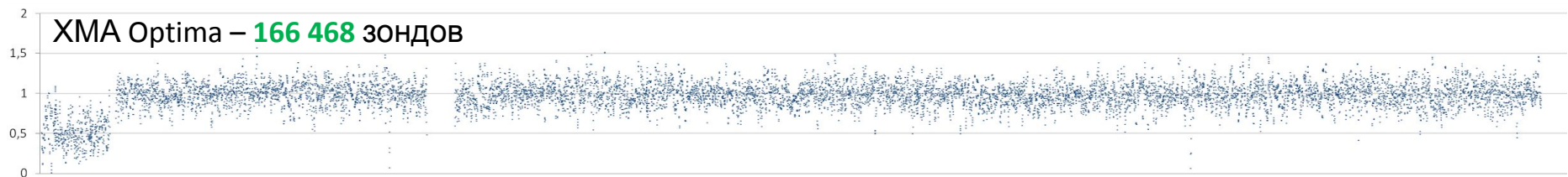
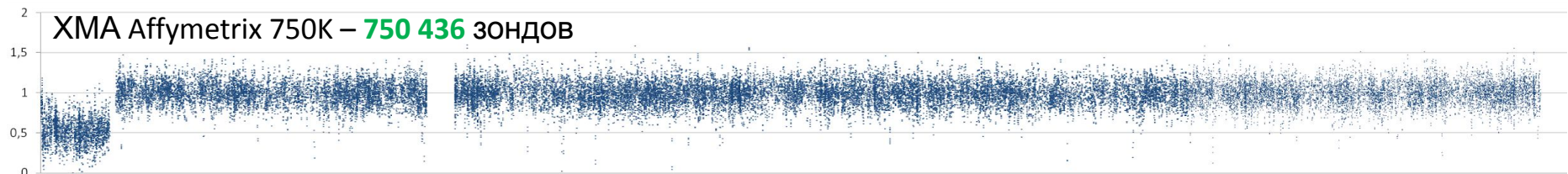
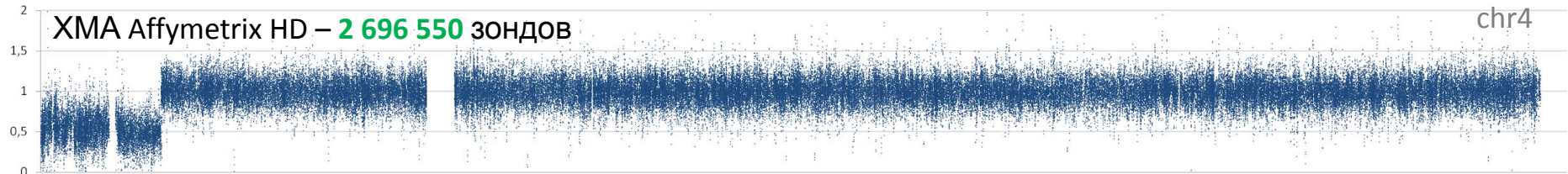
(Merlin G. Butler et al. «Specific Genetic Diseases at Risk for Sedation/Anesthesia Complications» *Anesth Analg* 2000;91:837–55)

Синдром	Возможные осложнения						
	Нарушение проходимости и дых. путей	Нарушение механики дыхания	Желудочный рефлюкс	Сердечно-сосудистые нарушения	Нервно-мышечные нарушения	Болезни печени	Болезни почек
Синдром Ангельмана					+		
Синдром Беквита-Видемана	+	+		+	+	+	+
Синдром делеции 3p25-pter	+			+	+		+
Синдром делеции 4q31-qter	+	+	+	+	+		+
Синдром делеции 9p22-pter	+	+		+	+		+
Синдром делеции 22q11.2	+	+		+	+		
Синдром дупликации 3q21-qter	+	+		+	+		+
Синдром дупликации 4p16.2-p15.1	+	+		+	+		+

# Анализ CNV: ХМА различной плотности (и NGS?)

с. Вольфа-Хиршхорна (del4p; различные образцы),

chr4



# Ограничения метода

- сбалансированные хромосомные перестройки (транслокации, инверсии)
- точковые мутации
- болезни экспансии тринуклеотидных повторов
- микроделеции/микродупликации, размер которых меньше разрешающей способности микроматрицы

# Какой метод выбрать?



GeneReviews® [Internet].

► [Show details](#)

GeneReviews by Title

[GeneReviews Advanced Search](#) [Help](#)

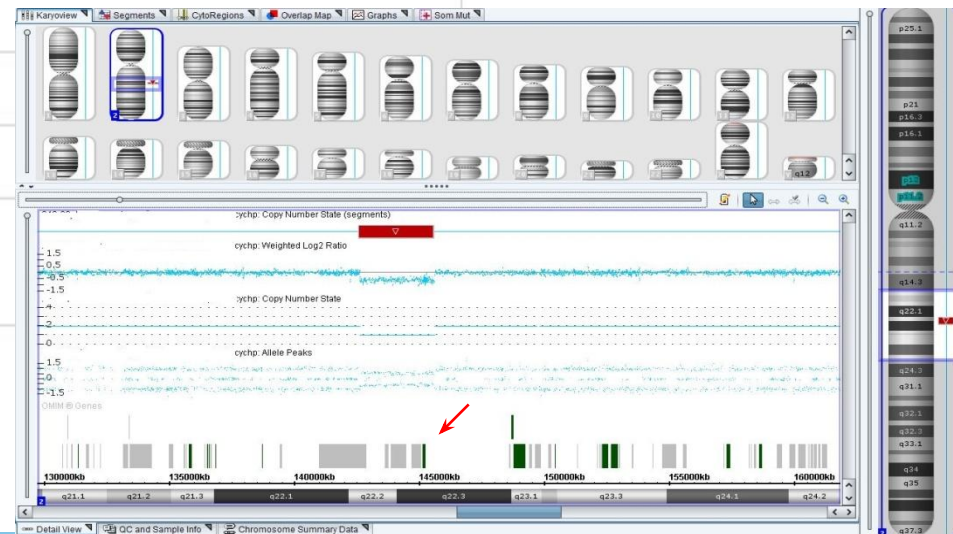
## Mowat-Wilson Syndrome

Synonym: Hirschsprung Disease-Mental Retardation Syndrome

Margaret P Adam, MD, MS, FAAP, FACMG, Jessie Conta, MS, LGC, and Lora JH Bean, PhD, FACMG.

### Summary of Testing Used in Mowat-Wilson Syndrome

Gene <sup>1</sup>	Test Method	Mutations Detected <sup>2</sup>	Mutation Detection Frequency by Test Method <sup>3</sup>
ZEB2	Cytogenetic analysis	Large-scale rearrangements	~2%
	Sequence analysis	Sequence variants <sup>4</sup>	~81% <sup>5,6</sup>
	<a href="#">FISH</a> analysis	Large deletions of ZEB2	~15% <sup>7</sup>
	<a href="#">Deletion/duplication analysis</a> <sup>8</sup>	Exonic or whole-gene deletions	~2% <sup>9</sup>



**Множественные врожденные аномалии развития. Задержка развития и аутизм без других характерных фенотипических признаков**

**ПРИЗНАКИ, ХАРАКТЕРНЫЕ ДЛЯ ГРУППЫ ЗАБОЛЕВАНИЙ (напр. наследственные эпилепсии, нервно-мышечные заболевания)**

**СПЕЦИФИЧЕСКИЙ ФЕНОТИП**



**Хромосомный микроматричный анализ**

**ПАНЕЛИ ГЕНОВ**

**ТАРГЕТНЫЕ МЕТОДЫ**



**Секвенирование митохондриального генома**

**Полноэкзомное секвенирование трио**



# Как выбрать лабораторию?

## Что хочет врач?

- Поставить диагноз назначив одно исследование

## Чего хотят родители пациента?

- Вылечить ребенка
- Заплатить меньше
- Получить результат быстрее

## Что предлагает лаборатория?

- Опыт (проведен анализ более 1000 пациентов)
- Качество (работа на оборудовании и реагентах экспертного уровня)
- Клиническая интерпретация
- Информационная поддержка врача и пациента

# Знание генотипа - ключ к успешному лечению

<b>Синдром</b>	<b>Лечение</b>
Недостаточность биотинидазы	Биотин
Гипомагниземия 1 типа	Препараты магния
Пиридоксин-зависимые судороги	Введение пиридоксаль-гидрохлорида



# Сколько слов должно быть в направлении?

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

проконсультирована с целью уточнения диагноза. У девочки множественные врожденные пороки развития: микрофтальм, микрокорнеа, ВПС (ДМЖП), диспластичность пальцев рук, врожденный вывих тазобедренных суставов.

Проведенное исследование – хромосомный микроматричный анализ – исключил наличие микроделеционных синдромом, хромосомный дисбаланс по микроперестройкам хромосом. У девочки была обнаружена трисомия X хромосомы при цитогенетическом исследовании на первых месяцах жизни.

При коллегиальном осмотре отмечены пороки развития и фенотипические особенности девочки, которые позволяют обосновать диагноз синдром грима Кабуки.

Девочка нуждается в продлении инвалидности, наблюдении офтальмолога, кардиолога, ортопеда.

Данный синдром в подавляющем большинстве случаев относится к спорадическим случаям, повторный риск не превышает общепопуляционное значение. Следует помнить о возрастном риске хромосомной патологии (в данном случае он достигает 1.5%)

## Сколько слов должно быть в направлении?

Выявлена ранее не описанная гетерозиготная мутация в 51 экзоне гена *KMT2D* (chr12:49416511G>T), приводящая к появлению сайта преждевременной терминации трансляции в 5400 кодоне (p.Tyr5400Ter, NM\_003482.3).

Гетерозиготные мутации в гене *KMT2D*, нарушающие синтез полноразмерного белка, описаны у пациентов с синдромом Кабуки, тип 1 (OMIM: 147920). Мутация не зарегистрирована в контрольных выборках "1000 геномов", ESP6500 и ExAC. Поскольку мутация нарушает синтез полноразмерного белка, ее следует расценивать как вероятно патогенную.

# Мифы и реальность

**Расхожий миф: для проведения современных генетических исследований необходимо куда-то ехать...**

**это не так!**



**г. Нижний Новгород, Верхневолжская наб.  
2Б**

**+7(986) 725-25-25**

**и другие города России**

# Заключение

**Для правильного выбора генетического исследования имеет значение:**

- Фенотип пациента
- Особенности клинической картины пациента
- Наличие признаков генетически гетерогенного заболевания
- Наличие МВПР
- Данные о частотах тех или иных молекулярных нарушений при предполагаемом синдроме

# Заключение

**Для правильной интерпретации данных, нужно:**

- Направить пациента на консультацию генетика
- Сопоставить клинику и фенотип, описанные при выявленном варианте с наблюдающимися у пациента
- Использовать литературу и базы данных
- Использовать методы подтверждающей диагностики

**СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ**

8-925-153-50-45

[dr.kanivets@genomed.ru](mailto:dr.kanivets@genomed.ru)