

ДОСТИЖЕНИЯ, СЕНСАЦИИ И ТРУДНОСТИ ПРЕНАТАЛЬНОЙ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

© В.С. Баранов, Т.К. Кашеева, Т.В. Кузнецова

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», г. Санкт-Петербург

Поступила в редакцию: 02.03.2016

Принята к печати: 13.04.2016

■ В обзоре рассмотрены достижения и сенсации, связанные с новыми подходами и методами в области вспомогательных репродуктивных технологий и пренатальной диагностики. Основное внимание уделено секвенированию нового поколения (NGS), сравнительной геномной гибридизации на матрице (aCGH), редактированию генома (метод CRISPR/Cas9), клеточной и генной терапии эмбрионов, неинвазивной пренатальной диагностике, преконцепционному тестированию. Обсуждаются проблемы внедрения инноваций, способы их решения и возможные источники ошибок.

■ **Ключевые слова:** секвенирование нового поколения; предимплантационная генетическая диагностика; неинвазивная пренатальная диагностика; генетическая карта репродуктивного здоровья; проспективное генетическое тестирование.

ACHIEVEMENTS, SENSATIONS AND PROBLEMS OF MOLECULAR PRENATAL DIAGNOSTICS

© V.S. Baranov, T.K. Kascheeva, T.V. Kuznetzova

Federal State Budget Scientific Institution "The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O. Ott", Saint Petersburg

For citation: Journal of Obstetrics and Women's Diseases, 2016, vol. 65, No 2, pp. 70-80

Received: 02.03.2016

Accepted: 13.04.2016

■ Some novel molecular and cell methods implicated into assistant reproductive technology and prenatal diagnostics are reviewed. Special attention is paid to new generation sequencing (NGS) technique, arrayCGH, genome editing (CRISPR/Cas9 method), cell and gene therapy of embryos as well as to non-Invasive prenatal diagnostics and pre-conception testing. Benefits, drawbacks and problems accompanying massive invasion of these technologies into PD and ART are discussed.

■ **Keywords:** new generation sequencing; preimplantation genetic diagnostics; noninvasive prenatal diagnostics; genetic card of reproductive health; prospective genetic testing.

Введение

Предсказанная учеными в конце XX века генетическая революция свершилась. Расшифрован геном человека и многих других организмов. Это эпохальное достижение науки стимулировало переход всей биологии и медицины на генетические рельсы, то есть на решение фундаментальных проблем биологии и практических задач медицины с позиции структурно-функциональной организации генома [1]. Особенно впечатляют последние достижения в понимании генетических механизмов нормального и патологического развития человека, в решении проблем репродукции и диагности-

ки наследственных болезней, в том числе и пренатальной [2, 3].

Наряду с несомненными успехами в наблюдении беременных существует мнение, что быть беременной в XXI веке «трудно, как никогда» [4]. В чем же причины такого парадокса? Почему сегодня, в век эффективных молекулярно-генетических технологий, остается справедливым известное библейское утверждение, что «многие знания множат скорбь». Отчасти это объясняется спецификой молекулярно-генетических исследований, сложностями адаптации новых технологий к решению конкретных

Таблица 1

Новые молекулярно-генетические методы и технологии в пренатальной диагностике и вспомогательных репродуктивных технологиях

Метод	Название (англ.)
Предимплантационная генетическая диагностика (ПГД)	Preimplantation genetic diagnosis (PGD)
Предимплантационный генетический скрининг (ПГС)	Preimplantation genetic screening (PGS)
Сравнительная геномная гибридизация на матрице	Comparative genome hybridization (arrayCGH, aCGH)
Клеточная и генная терапия зародышей	Cell and Gene Embryonic Therapy
Секвенирование нового поколения	New Generation Sequencing (NGS)
Неинвазивная пренатальная диагностика (НИПД)	Noninvasive prenatal diagnosis (NIPD)
Неинвазивное пренатальное тестирование (НИПТ)	Noninvasive prenatal testing (NIPT)
Прогностическое генетическое тестирование (ПГТ)	Prognostic Genetic Testing (PGT)

практических задач, отсутствием общепринятых алгоритмов и стандартов, трудностями адекватной интерпретации полученных результатов. Поэтому вместе с важными достижениями и даже сенсациями, связанными с новыми подходами и методами, применяющимися в области вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) и пренатальной диагностики (ПД), в обзоре рассмотрены и некоторые проблемы, возникающие на пути широкого внедрения инноваций, способы их решения и возможные источники ошибок.

Современные методы ПД (цитогенетические, биохимические и молекулярно-генетические) рассмотрены в соответствующих методических рекомендациях и руководствах [3, 5, 6]. С помощью этих методов возможна эффективная диагностика наследственных болезней и врожденной патологии на любых стадиях антенатального развития.

Новые молекулярно-генетические методы, существенно увеличивающие эффективность ПД хромосомных и генных болезней и возможности ВРТ, приведены в табл. 1.

1. Достижения вспомогательных репродуктивных технологий и новые методы предимплантационной генетической диагностики

До недавнего времени для диагностики хромосомных аномалий и скрининга частых анеуплоидий в циклах ВРТ широко использовали методы гибридизации *in situ* (FISH), реже — полимеразной цепной реакции (ПЦР) на единичных клетках (полярные тельца, изолированные бластомеры от дробящихся эмбри-

онов). Однако анализ одной клетки не позволяет выявить хромосомный мозаицизм, столь характерный для эмбрионов в период дробления. Более точная информация о хромосомном наборе может быть получена на нескольких клетках трофэктодермы на стадии бластоцисты. По мнению ряда ведущих специалистов по ВРТ, метод FISH ввиду его неточности для предимплантационного генетического скрининга (ПГС) «умер и похоронен» [7]. Значительно более информативными и эффективными для предимплантационной генетической диагностики (ПГД) и ПГС хромосомных аномалий являются сравнительная геномная гибридизация на матрице (aCGH) и секвенирование нового поколения (NGS) с предварительной полногеномной амплификацией (ПГА) ДНК, выделенной из клеток трофобласта [8, 9].

Для ПГД моногенных болезней обычно используется мини-секвенирование в сочетании с мультиплексной ПЦР для анализа сцепления по множеству внутригенных или внегенных полиморфных микросателлитных повторов [10]. В качестве альтернативы ПЦР для гаплотипирования предложен новый подход — кариокартирование (karyomapping), включающий ПГА и последующий анализ тысяч однонуклеотидных замен с известной локализацией в геноме [8, 10].

На точность ПГД генных и хромосомных болезней, основанной на ПГА, влияют множество факторов [11], поэтому в зависимости от исследуемого материала (полярное тельце, бластомер или клетки трофэктодермы), показаний (моногенное заболевание, хромосомная перестройка или предимплантационный скрининг),

длительности ПГА и технологии дальнейшего анализа (ПЦР, aCGH, NGS) выбираются соответствующие коммерческие наборы, включающие положительные и отрицательные образцы контрольной ДНК [10, 11].

Таким образом, в настоящее время новые молекулярно-генетические технологии позволяют надежно диагностировать генные и хромосомные болезни уже на самых ранних стадиях развития и проводить отбор генетически полноценных зародышей, что существенно увеличивает эффективность ВРТ. В 2013 г. ученые Великобритании сообщили о рождении ребенка, у которого удалось впервые, по мнению авторов, исключить хромосомные, митохондриальные и даже многие генные болезни еще на доимплантационной стадии развития при секвенировании генома единичной клетки [12]. Достоверность такого тестирования для исключения всех моногенных болезней у этого ребенка еще требует подтверждения временем.

Заслуживают внимания и подходы, в которых молекулярно-генетические методы совмещаются с микроургией на эмбрионах. Так, с целью преодоления некоторых форм бесплодия, связанных с функциональной неполноценностью яйцеклеток, и для лечения митохондриальных болезней в феврале 2015 г. в Великобритании была официально одобрена технология получения «трехродительских» эмбрионов. С этой целью ядро из яйцеклетки с дефектными митохондриями переносят в предварительно энуклеированную донорскую яйцеклетку, полученную от здоровой женщины. После оплодотворения такой «гибридной» яйцеклетки возникает зародыш с нормальным митохондриальным геномом, полученным из яйцеклетки — донора ооплазмы [13].

Исследования по разработке и внедрению новых технологий в практику центров экстра-

корпорального оплодотворения (ЭКО) активно продолжаются. Появились перспективные научные разработки, которые еще не получили клинического применения. К ним прежде всего следует отнести экспериментальные работы по редактированию (коррекции) ошибок генома на стадии зиготы (табл. 2).

После открытия ПЦР в 1986 г. ни один метод не стал такой сенсацией в научном мире, как технология редактирования генома с помощью генно-инженерной системы CRISPR/Cas9 (от англ. Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats и названия бактериального фермента Cas9). Разработанная в 2012 г. американской исследовательницей Дженнифер Дунда (Jennifer Doudna) и немецким ученым Эммануэлем Шарпантье (Emmanuel Charpentier) [14] технология CRISPR/Cas9 впервые позволила направленно исправлять или вносить в геном новые мутации, то есть манипулировать отдельными генами, не затрагивая другие области генома. Этот подход уже был использован в экспериментах по коррекции мутаций, вызывающих тяжелые наследственные болезни (муковисцидоз [15], миодистрофия Дюшенна [16], дегенерация сетчатки глаза [17]), для лечения инфекционных заболеваний (ВИЧ) [18] и в исследованиях тонкой структурно-функциональной организации генома человека. Недавно с помощью этой технологии были проведены эксперименты на мышах, а затем на зиготах человека для коррекции мутаций гена β -глобина, вызывающих тяжелое и частое наследственное заболевание — β -талассемию [19]. Результаты этих экспериментов вызвали большой научный резонанс. Однако коррекция мутации β -глобинового гена оказалась успешной только в некоторых зиготах. При этом было отмечено несовершенство технологии и появление незапланированных изменений (мутаций) в других

Таблица 2

Сенсации в пренатальной диагностике

Название	Цель
Редактирование генома	Коррекция мутаций
Генная терапия плода	Лечение моногенных болезней
НИПД	Альтернатива инвазивной пренатальной диагностике (ИПД)
НИПТ	Альтернатива раннему пренатальному скринингу (РПС)
Женские и мужские гаметы из стволовых клеток	Лечение бесплодия
ПГД для направленной селекции по полу и фенотипу	Социальные показания

участках ДНК. Высказано мнение о необходимости принятия срочного международного моратория на проведение подобных исследований на ранних зародышах и половых клетках человека [20].

Весьма неожиданным в этой связи явилось сообщение о том, что в Институте им. Ф. Крика в Лондоне в 2015 г. разрешено проведение экспериментов на генетически модифицированных зиготах человека с целью идентификации и выяснения функций генов, контролирующих ранние стадии развития человека [21]. Предполагается, что идентификация таких генов, анализ их экспрессии в норме и при патологии позволит в будущем существенно повысить эффективность ВРТ.

Еще одной сенсацией представляются успехи экспериментов по искусственному получению пригодных для ЭКО мужских и женских гамет из эмбриональных и соматических стволовых клеток [22]. Для этого соматические клетки вначале трансформируют в стволовые клетки iPSCs (англ. Induced Pluripotent Stem Cells), которые затем с помощью специфических индукторов превращают в мужские и женские гаметы, способные к оплодотворению [23]. Однако юридические аспекты искусственного получения гамет и эмбрионов из стволовых клеток, в том числе и индуцированных соматических клеток, пока не решены [24].

Серьезные опасения мировой и научной общественности высказываются в отношении направленной селекции зародышей еще на доимплантационных стадиях развития в зависимости от пола, особенностей фенотипа, наличия мутаций, приводящих к заболеваниям, которые уже поддаются лечению. Создание детей «на заказ», то есть не только здоровых, но и с заданным фенотипом, считается недопустимым с этических позиций [25].

2. Неинвазивная пренатальная диагностика

Возможности молекулярно-генетических исследований доимплантационных зародышей в значительной степени лимитированы микроскопическими размерами объекта (единичные бластомеры или немногочисленные группы клеток трофобласта) и, соответственно, минимальным количеством ДНК, которую необходимо предварительно амплифицировать, что само по себе чревато спонтанными ошибками. Образцы биоматериала от зародышей после имплантации существенно упрощают техно-

логии ПД и, следовательно, уменьшают вероятность методических ошибок, столь частых при ВРТ.

Для молекулярно-генетической диагностики различных генных и хромосомных болезней у зародышей постимплантационных стадий уже более 20 лет назад разработаны и широко используются различные прецизионные методы, рассмотренные в соответствующих руководствах и методических рекомендациях [3, 26, 27]. Новые усовершенствованные молекулярно-генетические методы диагностики, такие как методы матричного хромосомного анализа (aCGH) и секвенирования ДНК (экзомное, таргетное, полногеномное), уже более 10 лет активно внедряются в практику диагностики и верификации генных и хромосомных болезней.

Решающий перелом в ПД произошел после 2006 г., когда впервые была показана принципиальная возможность диагностики хромосомных, а впоследствии и генных болезней путем анализа свободной ДНК плода, присутствующей в крови женщин начиная с 4–5-й недели беременности. Технология получила название НИПД — неинвазивной пренатальной диагностики или НИПТ (неинвазивного пренатального тестирования) и с 2015 г. была официально рекомендована Международной ассоциацией ПД (ISPD) для скрининга частых хромосомных болезней.

Вместе с тем как за рубежом, так и в нашей стране на протяжении последних лет идет оживленная полемика в отношении преимуществ и ограничений НИПТ. Бурные дебаты вызывает вопрос о том, в какой мере НИПД может заменить традиционные алгоритмы ПД. Ниже мы вернемся к рассмотрению этой важной проблемы.

Технология НИПД позволяет осуществлять неинвазивную диагностику хромосомных и генных болезней с использованием плавающей в крови женщины плодной ДНК уже с 9-й недели беременности. С помощью секвенирования нового поколения (NGS) и специальных компьютерных программ даже в минимальном количестве ДНК плода, составляющем 5–10 % по отношению к общему количеству ДНК в крови беременной женщины, удается с высокой вероятностью (97–99 %) определить наличие у плода частых хромосомных болезней, включая синдром Дауна, другие трисомии, нарушения числа половых хромосом, многие микроделеционные синдромы и даже ряд генных заболеваний [28–30].

Методы неинвазивной пренатальной диагностики начал разрабатывать в 1997 г. китайский ученый Питер Ло, а уже в 2011 г. четыре

Таблица 3

Текущие параметры программ неинвазивного тестирования самых крупных фирм-производителей на 2014 г. (Evans et al., 2015)

Название фирмы/название программы	Технология	Метод анализа и интерпретации	Исследуемые хромосомы	Ограничения по отбору образцов крови	Опубликованные данные об отсутствии результатов на 1-м этапе
Лаборатории Секвеном / Матерни 21 Плюс	Полногеномное (массивное параллельное) секвенирование	Расчет Z-показателя на основе оптимизированных методов биоинформатики Положительный или отрицательный результат	21, 18, 13, X, Y, 22*, 16*, 22q*, 15q*, 11q*, 8q*, 5p*, 4p*, 1p*	Одноплодные, двойни, многоплодные, ЭКО с донорской яйцеклеткой	0,9 % ~1/100 беременных
Ариоза / Гармония	Прицельное секвенирование	DANSR** - and FORTE***-алгоритм Оценка риска	21, 18, 13, X, Y	Одноплодные, двойни, ЭКО с донорской яйцеклеткой	4,6 % ~1/22 беременных
Нагера / Панорама	Прицельное секвенирование регионов и анализ с помощью SNP****	Выбор гипотезы «максимального соответствия / правдоподобия» по данным SNP Оценка риска	21, 18, 13, X, Y	Одноплодные	8,1 % ~1/12 беременных
Верината / Верилай	Полногеномное (массивное параллельное) секвенирование	Алгоритм оценки числа повторов Анеуплоидия обнаружена / подозревается / не обнаружена	21, 18, 13, X, Y	Одноплодные, двойни, ЭКО с донорской яйцеклеткой	5,8 % ~1/17 беременных

* Можно добавлять или удалять исследуемые хромосомы.
 ** DANSR — Digital Analysis of Selected Regions — Подсчет и анализ выборочных регионов (длина секвенируемой ДНК примерно в 10 раз меньше, чем при полногеномном исследовании).
 *** FORTE — Fetal-fraction Optimized Risk of Trisomy Evaluation — Оптимизированная оценка риска трисомии по фетальной фракции.
 **** SNP — однонуклеотидные замены.

крупные американские корпорации предложили свои тест-системы для проведения НИПД. Основные показатели работы этих фирм, по данным на 2014 г., приведены в табл. 3.

Учитывая, что потенциальный рынок НИПД в мире составляет около 1 миллиарда анализов в год, а стоимость одного теста на сегодня в среднем примерно \$500, вокруг этой технологии возник ажиотаж и яростная конкуренция. Уже к 2014 г. сотням тысяч беременных в США и в Китае была проведена диагностика с помощью этого метода. В настоящее время число НИПД в мире уже составляет несколько миллионов [31–33].

Учитывая высокую эффективность метода, 79 % американских врачей считают, что неинвазивное пренатальное тестирование по крови матери (НИПТ) уже может быть использовано для скрининга синдрома Дауна, а 46 % американских врачей предлагают заменить всю ПД на НИПД [28].

Несмотря на очевидные преимущества, широкое и зачастую необдуманное использование НИПД чревато серьезными осложнениями. Так, по мнению профессора Иванс [30], вследствие опережающего коммерческого внедрения НИПД в практику в США существенно ухудшилось медицинское наблюдение при беременности. После получения результатов неинвазивного тестирования в ранние сроки без грамотного медико-генетического консультирования пациентки нередко отказываются даже от УЗИ. Ощущается нехватка грамотных специалистов, консультирующих беременных до и после НИПТ, многие опасаются роста необоснованных прерываний беременности по немедицинским показаниям или в связи с наличием заболеваний, не приводящих к тяжелой инвалидизации после рождения. Впервые коммерческое применение новой технологии опередило всестороннее научное исследование последствий ее применения на практике.

Следовательно, несмотря на определенные недостатки и ограничения, НИПД и НИПТ стали настоящим прорывом в ПД во многих развитых экономических странах Америки, Западной Европы и Китая.

Значительно сложнее и неоднозначно обстоит дело с внедрением НИПД в России. Чтобы понять сложность проблемы, ее принципиальное значение для выбора правильного стратегического курса развития НИПД в РФ, необходимо рассмотреть состояние ПД частых хромосомных нарушений у плода в нашей стране.

В этой связи важно отметить, что еще в 2010 г. по инициативе МЗ РФ в России была внедрена Территориальная программа раннего пренатального скрининга (Постановление № 1141 от 27.12.2010 и № 1066 от 21.12.2011 Правительства Российской Федерации, Приказ № 572 от 1 ноября 2012 г. МЗ РФ). Ранний пренатальный скрининг (РПС) (по сути — комбинированный биохимический и экспертный ультразвуковой скрининг в 1-м триместре), выполняемый согласно Национальному приоритетному проекту «Здоровье», соответствует международным стандартам, разработанным Фондом фетальной медицины, и позволяет выявить женщин групп высокого риска по рождению детей с частыми хромосомными нарушениями (трисомии хромосом 13, 18 и 21), а также анатомические дефекты у плодов. Применение этого метода во многих регионах РФ привело к резкому повышению эффективности ПД хромосомных болезней и ВПР. При этом эффективность выявления плодов с самой частой хромосомной патологией (болезнь Дауна — трисомия хромосомы 21) достигла во многих центрах РФ 70–80 %, что соответствует лучшим мировым показателям эффективности РПС [34, 35].

На фоне этих очевидных достижений ПД, с учетом высокой стоимости НИПТ, отсутствия специального дорогостоящего оборудования, отечественных реактивов и соответствующих компьютерных программ, необходимо отметить, что отношение специалистов к методу НИПД в России неоднозначно и противоречиво. С одной стороны, как метод пренатального скрининга (НИПТ) он почти в 10 раз эффективнее, чем стандартный РПС, и потому его внедрение в службу ПД следует приветствовать. Однако, с другой стороны, он более чем в 100 раз дороже РПС и его внедрение в масштабах страны помимо больших финансовых

вложений от государства потребует серьезной реорганизации уже отлаженной и достаточно эффективно функционирующей службы ПД. Важно отметить также, что НИПТ еще не имеет официальной сертификации и утвержденных стандартов. В России он пока реально осуществляется только в двух учреждениях (ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.Н. Кулакова» МЗ РФ и ЗАО «Геноаналитика», г. Москва) [36, 37]. Еще 5–7 фирм-посредников отправляют материал (кровь беременной) за рубеж (в США или КНР), где популярность НИПТ и НИПД быстро увеличивается. При этом, насколько нам известно, не решена правовая сторона отсылки образцов крови за рубеж и отсутствуют внятные юридические, этические и правовые положения такой «трансферной» ПД.

Таким образом, проблема внедрения НИПТ в России очень сложна и требует специальной проработки на профессиональном, государственном и муниципальном уровнях. По всей видимости, для ее реализации целесообразно возратить в состав медико-генетической службы страны Федеральные медико-генетические центры, существовавшие с 1993 г. и *de facto* упраздненные в 2014 г. Именно эти центры отвечали за разработку и внедрение в практику молекулярно-генетической диагностики наследственных болезней, имеют наибольший опыт в практическом применении научных достижений. Наличие современного необходимого оборудования и высококвалифицированных специалистов позволяет сосредоточить в них всю НИПД. По этическим, финансовым и организационным соображениям эту технологию не следует расплывать по регионам. При этом НИПД должна гармонично сочетаться с уже существующим и хорошо зарекомендовавшим себя алгоритмом пренатальной диагностики в России, но не подменять его полностью. Сотрудники ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.Н. Кулакова» уже подготовили и передали в Министерство здравоохранения методические рекомендации по использованию технологии НИПД, однако при наличии только одного государственного центра на всю страну на фоне серьезных медицинских и финансово-экономических проблем широкое внедрение НИПД в России преждевременно.

Следует также учитывать, что при всей своей очевидной привлекательности технология НИПД не лишена и недостатков. К таковым

относятся: неудачные попытки НИПД (отсутствие результата в 8–11 % случаев, возможность повторной сдачи крови в более поздние сроки) в связи с низким (менее 4 %) содержанием ДНК плода в крови матери; сложности дифференциального анализа ДНК в условиях многоплодной беременности, мозаицизма хромосом в плаценте или у плода, перестроек хромосом у родителей, а также в случае кровнородственного брака. Другие ограничения НИПД, о которых следует помнить при использовании этой технологии, касаются как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов; обусловлены отсутствием официальных стандартов проведения анализа, относительно высокой стоимостью и существенным дефицитом специалистов, способных грамотно интерпретировать результаты НИПД. В зарубежной литературе отмечается увеличение числа неоправданных прерываний беременности после НИПД, нарушение устоявшегося алгоритма ПД, материальные, технические, социальные и организационные сложности на пути внедрения НИПД [30, 33].

Активная реклама НИПД в России, проводимая частными фирмами в центрах ПД и среди врачей-акушеров, наблюдающих беременных, уже привела к сходным ситуациям и осложнениям. Необходимо помнить, что назначение НИПД должно сопровождаться пре- и пост-

тестовым консультированием врача-генетика, а положительный результат НИПД необходимо подтверждать с помощью стандартных методов инвазивной пренатальной диагностики и исследования образцов плодного происхождения, что, увы, соблюдается далеко не всегда [38].

3. Прогностическое генетическое тестирование

В связи с появлением эффективных высокопроизводительных методов анализа генома, прежде всего методов NGS, окрепло и приобрело второе дыхание прогностическое генетическое тестирование (ПГТ) с целью обследования супругов, планирующих рождение ребенка, на носительство мутаций в генах, приводящих к наследственным заболеваниям у детей [39]. Еще в 2008 г. в НИИ АГиР им. Д.О. Отта была разработана и активно используется Генетическая карта репродуктивного здоровья (ГКРЗ) (рис. 1), предусматривающая генетическое тестирование будущих родителей [40].

Помимо медико-генетического консультирования супругов и анализа кариотипа, в ГКРЗ предусмотрен анализ носительства мутаций в генах наиболее частых наследственных заболеваний, представляющих реальную угрозу для жизни будущего ребенка. К ним относятся муковисцидоз, миодистрофия Дюшенна, спинальная мышечная атрофия (Верднига – Гоффмана),

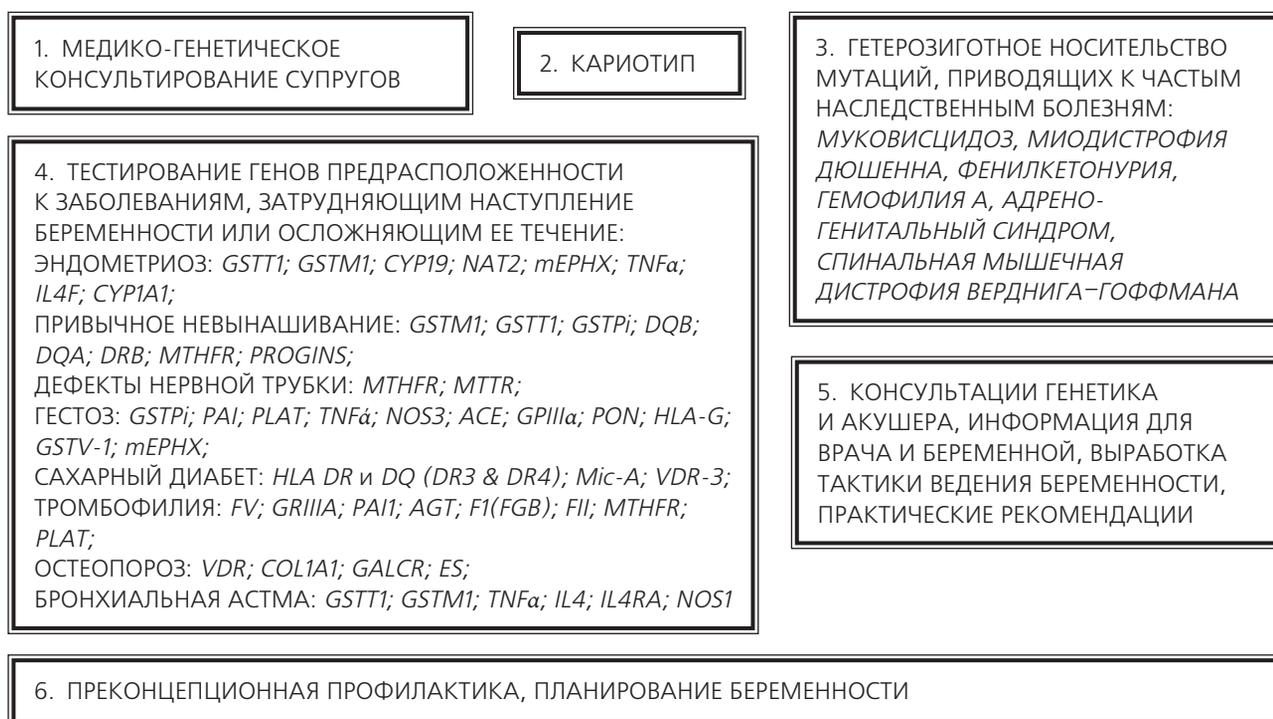


Рис. 1. Виды обследования будущих родителей для генетической карты репродуктивного здоровья семьи

Таблица 4

Ампликс-панели для диагностики моногенных и мультифакторных болезней методом NGS, разработанные в лаборатории пренатальной диагностики НИИ АГиР им. Д.О. Отта (одновременное тестирование от 300 до 2000 генов)

Панель	Гены частых наследственных заболеваний	Генетические маркеры сердечно-сосудистых заболеваний
Болезни	Аденоматозный полипоз толстой кишки, болезнь Вильсона – Коновалова, фенилкетонурия, гемофилии А и В, галактоземия тип I, врожденная тугоухость, гемохроматоз, рак толстой кишки, синдром Ретта, синдром Опица – Каведжиа, нейрофиброматоз I и II типов, поликистоз почек, хроническая обструктивная болезнь легких и ювенильный гамартоматозный полипоз желудка и кишечника	Наследственные кардиомиопатии и синдром внезапной смерти
Экзоны генов	<i>APC, ATP7B, PAH, F8, F9, GALT, GJB2, HFE, KRAS, MECP2, MED12, NF1, NF2, NKX2-5, PKD1, PKHD1, SERPINA1, SMAD4</i>	<i>ACTC1, MYBPC3, MYH7, MYL2, MYL3, TNNT2, TNNT3, TPM1, CASQ2</i>

гемофилия А и В, синдром ломкой X-хромосомы и др. Проспективное генетическое тестирование этих тяжелых болезней уже проводится во многих странах мира. Мутации гена муковисцидоза скринируют в большинстве стран Европы, спинальной мышечной атрофии — в Китае, носительство мутаций, ответственных за развитие синдрома неспецифической умственной отсталости, связанного с ломкой X-хромосомой, проверяют в Израиле. Учитывая возрастающий спрос на ПГТ, уже разработаны и используются специальные генетические панели, с помощью которых можно одновременно установить носительство мутаций нескольких сотен различных заболеваний [39, 41]. Специальные панели, разработанные в нашем институте, позволяют проводить скрининг более двух тысяч мутаций, ассоциированных с десятками различных заболеваний (частых наследственных болезней, кардиомиопатий и синдрома внезапной смерти, а также гены, включенные в ГКРЗ) (см. табл. 4, рис. 1). Тестирование генов проводится методом полногеномного NGS [42].

При преконцепционном скрининге на первом этапе проводится тестирование мутаций генов наследственного заболевания только у женщин; при положительном результате тестирования на втором этапе тестируются их супруги, на третьем этапе супругам — носителям выявленных мутаций предлагается схема ВРТ, включающая ПГД, отбор зародышей с отсутствием родительских мутаций и их трансплантацию в матку [39].

Таким образом, первичная профилактика наследственных и врожденных пороков развития, одним из элементов которой является Генетическая карта репродуктивного здоровья, в настоящее время превратилась в новое

быстро развивающееся научно-практическое направление — проспективное генетическое тестирование.

4. Некоторые спорные вопросы пренатальной диагностики и вспомогательных репродуктивных технологий

Далеко не всегда прогресс методов и новых технологий соответствует скорости их внедрения в практику. Как уже отмечалось, стремительное развитие и внедрение в медицинскую практику достижений молекулярной генетики, нередко прежде чем их полезность и безопасность будут твердо доказаны, приводит к шумному обсуждению научных сенсаций, вместо необходимых проверок с соблюдением всех правил, взвешенного и вдумчивого отношения к новым методам. К таким сенсациям последних лет относятся: исследования по редактированию генома зиготы и половых клеток; гарантия рождения заведомо здорового ребенка без наследственных болезней после полногеномного секвенирования или микрохромосомного анализа клеток доимплантационных зародышей; генная и клеточная терапия плода; создание искусственных гамет из соматических клеток. Много неопределенного и нерешенного остается и в проблеме внедрения методов НИПТ и НИПД.

В значительной мере это относится и к новым методам ВРТ и ПД. Действительно, современные технологии ВРТ находятся на таком уровне, что получение «пробирочного» ребенка из проблемы превратилось в рутинную медицинскую процедуру. Вместе с тем усложнение лабораторных методов диагностики настоятельно требует от врачей-специалистов ВРТ и ПД не только глубоких знаний в репро-

дуктологии, акушерстве и УЗИ, но и достаточной осведомленности в области молекулярной биологии, медицинской генетики, эмбриологии и других смежных дисциплин. Так, важно помнить, что использование метода ИКСИ (введение сперматозоида в яйцеклетку с помощью микроиглы) может привести к рождению заведомо бесплодных сыновей при наличии мутаций в генах Y-хромосомы у отца. Только тщательное молекулярно-генетическое и цитогенетическое исследование, дополненное консультацией врача-генетика, поможет избежать ошибок и принять оптимальное решение в таких случаях.

Высоко оценивая достижения науки в разработке новых эффективных технологий, следует помнить о частых ошибках, связанных как с самой технологией экзомного или полногеномного секвенирования, так и с трудностями объективной интерпретации полученных результатов. В равной мере следует осторожно оценивать результаты хромосомного анализа методом сравнительной геномной гибридизации на матрице, особенно при находках нарушений генома у плода и отсутствии таковых у родителей. Изменения в геноме, выявленные этими методами, необходимо проверять другими независимыми методами.

Таким образом, практическое использование достижений геномики человека в ПД и ВРТ требует большого опыта и слаженной работы не только специалистов по лабораторной генетике и биоинформатике, но и акушеров-гинекологов, репродуктологов, эмбриологов, неонатологов, а также врачей УЗИ, врачей-генетиков и других специалистов. Только в условиях комплексного подхода можно ожидать эффективных результатов в профилактике наследственных и врожденных болезней, снижении генетического груза популяции, повышении эффективности ЭКО и решении насущных демографических проблем.

Девиз ПД и сегодня, в эпоху геномики и новых технологий, остается тем же: «Ребенок должен родиться не только живым, но и здоровым!»

Литература

1. Генетика человека по Фогелю и Мотулски. Проблемы и подходы: пер. с англ. / ред. М.С. Спейчер, С.Е. Антонаракис, А.Г. Мотулски. – 4-е изд. – СПб.: Изд. Н-Л, 2013. – 1056 с. [Genetika cheloveka po Vogelyu i Motulsky. Problemy i podkhody: per. s angl. Ed by M.S. Speicher, S.E. Antonarakis, A.G. Motulski. 4th ed. Saint Petersburg: Izd. N-L; 2013. 1056 p. (In Russ).]
2. Баранов В.С., Кузнецова Т.В. Генетика развития человека // Наследственные болезни : национальное руководство / Н.П. Бочкова, Е.К. Гинтера, В.П. Пузырева. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – С. 81–125. [Baranov VS, Kuznetsova TV. Genetika razvitiya cheloveka. In: Nasledstvennyye bolezni : natsional'noe rukovodstvo. Ed by N.P. Bochkova, E.K. Gintera, V.P. Puzryeva. Moscow: GEOTAR-Media; 2012. P. 81-125. (In Russ).]
3. Баранов В.С., Кузнецова Т.В., Кашеева Т.К., и др. Современные алгоритмы и новые возможности пренатальной диагностики наследственных и врожденных заболеваний: метод. реком. – СПб.: Изд-во Н-Л, 2013. – 150 с. [Baranov VS, Kuznetsova TV, Kascheeva TK. Et al. Sovremennyye algoritmy i novyye vozmozhnosti prenatal'noy diagnostiki nasledstvennykh i vrozhdennykh zabolevaniy: metod. rekom. Saint Petersburg: Izd-vo N-L; 2013. 150 p. (In Russ).]
4. Галина Т.В., Добрецова Т.А. Беременная XXI века: трудно как никогда. Почему необходимо заботиться об оптимальном фолатном статусе беременной? Информационный бюллетень. – М.: StatusPraesens, 2015. – 20 с. [Galina TV, Dobretsova TA. Beremennaya XXI veka: trudno kak nikogda. Pochemu neobkhodimo zabotit'sya ob optimal'nom folatnom statuse beremennoy? Informatsionnyy byulleten'. Moscow: StatusPraesens; 2015. 20 p. (In Russ).]
5. Кузнецова Т.В., Логинова Ю.А., Чиряева О.Г., и др. Цитогенетические методы // Медицинские лабораторные технологии : руководство по клинической лабораторной диагностике. Т. 2. – 3-е изд. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – С. 623–657. [Kuznetsova TV, Loginova YA, Chiryayeva OG, et al. Tsitogeneticheskie metody. In: Meditsinskie laboratornyye tekhnologii: rukovodstvo po klinicheskoy laboratornoy diagnostike. Vol. 2. 3th ed. Moscow: GEOTAR-Media; 2013. P. 623-657. (In Russ).]
6. Иващенко Т.Э., Асеев М.В., Глотов А.С., Баранов В.С. Молекулярно-генетические методы // Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике. Т. 2. – 3-е изд. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – С. 658–687. [Ivashchenko TE, Aseev MV, Glotov AS, Baranov VS. Molekulyarno-geneticheskie metody. In: Meditsinskie laboratornyye tekhnologii: rukovodstvo po klinicheskoy laboratornoy diagnostike. Vol. 2. 3th ed. Moscow: GEOTAR-Media; 2013. P. 658-687. (In Russ).]
7. Turner K, Fowler K, Fonseka G, Griffin D, Ioannou D. Multicolour detection of every chromosome as a means of detecting mosaicism and nuclear organisation in human embryonic nuclei. *Panminerva Med.* 2016 Mar 16. [Epub ahead of print]
8. Harper JC, SenGupta SB. Preimplantation genetic diagnosis: state of the art. *Hum. Genet.* 2012.131:175-186.

9. Lukaszuk K, Jakiel G, Kuczynski W, et al. Next generation sequencing for preimplantation genetic testing of blastocysts aneuploidies in women of different ages. *Ann Agric Environ Med*. 2016 Mar;23(1):163-6. doi: 10.5604/12321966.1196874.
10. Fiorentino F, Biricik A, Nuccitelli A, et al. Strategies and clinical outcome of 250 cycles of Preimplantation Genetic Diagnosis for single gene disorders. *Hum Reprod*. 2006;21:670-84.
11. SenGupta SB, Dhanjal S, Harper JC. Quality control standards in PGD and PGS. *Reprod Biomed Online*. 2016 Mar;32(3):263-70. doi: 10.1016/j.rbmo.2015.11.020. Epub 2015 Dec 11.
12. Wells D. Next-generation sequencing: the dawn of a new era for preimplantation genetic diagnostics. *Fertil Steril*. 2014;101:1250-1251.
13. Amato P, Tachibana M, Sparman M, Mitalipov S. Three-parent in vitro fertilization: gene replacement for the prevention of inherited mitochondrial diseases. *Fertil Steril*. 2014 Jan;101(1):31-5. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.11.030.
14. Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014. 28;346(6213):1258096. doi: 10.1126/science.1258096.
15. Schwank G, Koo BK, Sasselli V, et al. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell*. 2013;13(6):653-658.
16. Wood H. Neuromuscular disease: CRISPR/Cas9 gene-editing platform corrects mutations associated with Duchenne muscular dystrophy. *Nat Rev Neurol*. 2015 Apr;11(4):184. doi: 10.1038/nrneurol.2015.37. Epub 2015 Mar 10.
17. Nash BM, Wright DC, Grigg JR, Bennetts B, Jamieson RV. Retinal dystrophies, genomic applications in diagnosis and prospects for therapy. *Transl Pediatr*. 2015 Apr;4(2):139-63. doi: 10.3978/j.issn.2224-4336.2015.04.03.
18. Tebas P, Stein D, Tang WW, et al. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N Engl J Med*. 2014; 370(10):901-910.
19. Yang Y, Zhang X, Yi L, et al. Naïve Induced Pluripotent Stem Cells Generated From β -Thalassemia Fibroblasts Allow Efficient Gene Correction With CRISPR/Cas9. *Stem Cells Transl Med*. 2016 Jan;5(1):8-19. doi: 10.5966/sctm.2015-0157. Epub 2015 Dec 16.
20. Araki M, Ishii T. International regulatory landscape and integration of corrective genome editing into in vitro fertilization. *Reprod Biol Endocrin*. 2014;12: 108-120.
21. Niakan KK, Eggan K. Analysis of human embryos from zygote to blastocyst reveals distinct gene expression patterns relative to the mouse. *Dev Biol*. 2013;375:54-64.
22. Tosca L, Courtot AM, Bennaceur-Griscelli A, Tachdjian G. *In vitro* strategies for human gametes production from stem cells. *Med Sci (Paris)*. 2011; 27(10):866-874. [Article in French]
23. Nakaki F, Hayashi K, Ohta H, et al. Induction of mouse germ-cell fate by transcription factors in vitro. *Nature*. 2013;501:222-226.
24. Nielen MG, de Vries SA, Geijsen N. European stem cell research in legal shackles. *EMBO J*. 2013;2(24):3107-3111.
25. Ижевская В.Л., Бочков Н.П. Этические вопросы медицинской генетики // Наследственные болезни : национальное руководство / Р.П. Бочков, Е.К. Гинтер, В.П. Пузырев. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – С. 888–928. [Izhevskaya VL, Bochkov NP. Eticheskie voprosy meditsinskoj genetiki. In: Nasledstvennyye bolezni : natsional'noe rukovodstvo. Ed by R.P. Bochkov, E.K. Ginter, V.P. Puzyrev. Moscow: GEOTAR-Media; 2012. P. 888-928. (In Russ).]
26. Баранов В.С., Кузнецова Т.В. Цитогенетика эмбрионального развития человека: научно-практические аспекты. – СПб.: Изд-во Н-Л, 2007. – 640 с. [Baranov VS, Kuznecova TV. Citogenetika jembrional'nogo razvitija cheloveka: nauchno-prakticheskie aspekty. Sain Petersburg: Izd-vo N-L; 2007. 640 p. (In Russ).]
27. Баранов В.С., Кузнецова Т.В., Иващенко Т.Э., и др. Пренатальная диагностика // Медицинская лабораторная диагностика: программы и алгоритмы: руководство для врачей / А.И. Карпищенко. – 3-е изд. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. – С. 308–346. [Baranov VS, Kuznecova TV, Ivashhenko TJ, et al. Prenatal'naja diagnostika. In: Medicinskaja laboratornaja diagnostika: programmy i algoritmy: rukovodstvo dlja vrachej. Ed by A.I. Karpishhenko. 3th ed. Moscow: GEOTAR-Media; 2014. P. 308-346. (In Russ).]
28. Benn P, Chapman AR, Erickson K, et al. Obstetricians and gynecologists practice and opinions of expanded carrier testing and noninvasive prenatal testing. *Prenat Diagn*. 2014;34:145-152.
29. Stumm A, Entezami V, Houg K, et al. Diagnostic accuracy of random massively parallel sequencing for non-invasive prenatal detection of common autosomal aneuploides : a collaborative study in Europe. *Prenat Diagn*. 2014;34:181-191.
30. Evans MI, Sonek JD, Hallahan TW, Kranz DA. Cell free fetal DNA screening in the USA : a cost analysis of screening strategy. *Ultrasound Obstetr Gynecol*. 2015;45:74-83.
31. Norton ME, Jelliffe-Pawlowski LL, Currier RJ. Chromosome abnormalities detected by current prenatal screening and noninvasive prenatal testing. *Obstet Gynecol*. 2014 Nov;124(5):979-86. doi: 10.1097/AOG.0000000000000452.

32. Веропотвелян Н.П., Погуляй Ю.С. Последние достижения в области неинвазивной пренатальной диагностики (NIPD/NIPT) и новые стратегии пренатального скрининга хромосомных аномалий // Пренатальная диагностика. – 2015. – Т. 14. – № 2. – С. 101–110. [Veropotveljan NP, Poguljaj JS. Poslednie dostizhenija v oblasti neinvazivnoj prenatal'noj diagnostiki (NIPD/NIPT) i novye strategii prenatal'nogo skringinga hromosomnyh anomalij. *Prenatal'naja diagnostika*. 2015;14(2):101-110. (In Russ).]
33. Kagan KO, Wright D, Nicolaides KH. First-trimester contingent screening for trisomies 21, 18 and 13 by fetal nuchal translucency and ductus venosus flow and maternal blood cell-free DNA testing. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015 Jan; 45(1):42-7.
34. Жученко Л.А., Голошубов П.А., Андреева Е.Н., и др. Анализ результатов раннего пренатального скрининга, выполняющегося по национальному приоритетному проекту «Здоровье» в субъектах Российской Федерации // Медицинская генетика. – 2014. – Т. 6. – № 3. – С. 54. [Zhuchenko LA, Goloshubov PA, Andreeva EN, et al. Analiz rezul'tatov rannego prenatal'nogo skringinga, vypolnjajushhegosja po nacional'nomu prioritetnomu projektu «Zdorov'e» v sub#ektah Rossijskoj Federacii. *Medicinskaja genetika*. 2014;6(3):54. (In Russ).]
35. Жученко Л.А., Андреева Е.Н., Одегова Н.О., Голошубов П.А. Анализ эффективности новых диагностических подходов в Российской Федерации к пренатальной диагностике частых генетических заболеваний, имеющих медицинскую и социальную значимость // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2015. – Т. 15. – № 6. – С. 12–16. [Zhuchenko LA, Andreeva EN, Odegova NO, Goloshubov PA. Analiz jeffektivnosti novyh diagnosticheskikh podhodov v Rossijskoj Federacii k prenatal'noj diagnostike chastyh geneticheskikh zabolevanij, imejushhijh medicinskuju i social'nuju znachimost'. *Rossijskij vestnik akushera-ginekologa*. 2015;15(6): 12-16. (In Russ).]
36. Сухих Г.Т., Каретникова Н.А., Баранова Е.Е., и др. Неинвазивная пренатальная диагностика анеуплоидий методом высокопроизводительного секвенирования (NGS) в группе женщин высокого риска // Акушерство и гинекология. – 2015. – № 4. – С. 5–10. [Suhih GT, Karetnikova NA, Baranova EE, et al. Neinvazivnaja prenatal'naja diagnostika aneuploidij metodom vysokoproizvoditel'nogo sekvenirovanija (NGS) v gruppe zhenshhin vysokogo riska. *Akusherstvo i ginekologija*. 2015;(4):5-10. (In Russ).]
37. Pantiukh KS, Chekanov NN, Zaigrin IV, et al Report on noninvasive prenatal testing: classical and alternative approaches. *F1000Research*. 2016;5:722.
38. Кащеева Т.К., Баранов В.С. Биохимический пренатальный скрининг в эпоху эры неинвазивной диагностики. Вместе или врозь? // Медицинская генетика. – 2015. – № 7 (157). – С. 3–8. [Kasheeva TK, Baranov VS. Biohimicheskij prenatal'nyj skringing v jepohu jery neinvazivnoj diagnostiki. Vmeste ili vroz'? *Medicinskaja genetika*. 2015;7(157):3-8. (In Russ).]
39. Kingsmore S. Preconceptional testing by NGS. *Repr Biomed Online*. 2012; 24, Suppl.2. P. 27-29.
40. Генетический паспорт – основа индивидуальной и предиктивной медицины / В.С. Баранов. – СПб.: Изд-во Н-Л, 2009. – 528 с. [Geneticheskij pasport – osnova individual'noj i prediktivnoj mediciny. Ed by V.S. Baranov. Saint Petersburg: Izd-vo N-L; 2009. 528 p. (In Russ).]
41. Gal M, Khmermesh K, Barak M, et al. Expanding preconception carrier screening for the Jewish population using high throughput microfluidics technology and next generation sequencing. *BMC Med Genomics*. 2016 May 13;9(1):24. doi: 10.1186/s12920-016-0184-7.
42. Glotov AS, Kazakov SV, Zhukova EA, et al. Targeted next-generation sequencing (NGS) of nine candidate genes with custom AmpliSeq in patients and a cardiomyopathy risk group. *Clin Chim Acta*. 2015 Jun 15;446:132-40. doi: 10.1016/j.cca.2015.04.014. Epub 2015 Apr 17.

■ Адреса авторов для переписки

Владислав Сергеевич Баранов — заведующий лабораторией пренатальной диагностики ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта». E-mail: baranov@VB2475.spb.edu.

Татьяна Константиновна Кащеева — вед. науч. сотр. лаборатории пренатальной диагностики ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта». E-mail: tkklpd@mail.ru.

Кузнецова Татьяна Владимировна — вед. науч. сотр. лаборатории пренатальной диагностики ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта». E-mail: tkuznetzova@mail.ru.

Vladislav S. Baranov — head of Laboratory of prenatal diagnosis of inherited and inborn disorders in FSBSI “The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O. Ott”, Dr. Med. Sci, professor, corresponding member of Russian Academy of Science.

Tatyana K. Kasheeva — leading researcher of Laboratory of prenatal diagnosis of inherited and inborn disorders in FSBSI “The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O. Ott”, Dr. Biol. Sci.

Tatyana V. Kuznetzova — leading researcher of Laboratory of prenatal diagnosis of inherited and inborn disorders in FSBSI “The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O. Ott”, Dr. Biol. Sci, associate professor.