

Изучение генетических основ и разработка новых подходов диагностики и лечения изолированных и сочетанных врожденных пороков развития

Актуальность исследования

Основную часть группы детей с врожденными пороками развития составляют дети с множественными пороками, генетические основы и молекулярно-клеточные механизмы формирования которых остаются мало изученными. Предполагается, что одной из причин возникновения тяжелых множественных врожденных пороков могут служить структурные хромосомные перестройки, затрагивающие единичный ген или группу генов, играющих ключевую роль в эмбриогенезе и функционировании сразу нескольких тканей и систем. В этой связи, определение спектра генных/хромосомных aberrаций при врожденных пороках требует комплексного использования современных подходов молекулярно-генетического и цитогенетического анализа высокого разрешения. Данный проект направлен на изучение генетических основ и разработку новых алгоритмов диагностики сочетанных и редких изолированных пороков, затрагивающих, главным образом, сердечно-сосудистую, мочевыделительную и дыхательную системы. Актуальность данного исследования определяется медико-социальной значимостью, отсутствием в отечественной и зарубежной литературе достаточной информации о распространенности, структуре, этапах диагностики и молекулярно-клеточных механизмах возникновения данных врожденных пороков развития.

Научная платформа

Педиатрия

Планируемый (ые) научные подразделения исполнители (с указанием руководителя исследования)

Руководитель исследования – директор Института молекулярной биологии и генетики ФГБУ "СЗФМИЦ им. В.А.Алмазова" Минздрава России Костарева А. А.

Исполнители:

Институт перинатологии и педиатрии ФГБУ "СЗФМИЦ им. В.А.Алмазова" Минздрава России

Институт сердца и сосудов ФГБУ "СЗФМИЦ им. В.А.Алмазова" Минздрава России

Институт молекулярной биологии и генетики ФГБУ "СЗФМИЦ им. В.А.Алмазова" Минздрава России

Кафедра клинической лабораторной диагностики и генетики ФГБУ "СЗФМИЦ им. В.А.Алмазова" Минздрава России

Ключевые слова

Множественные пороки развития, пороки сердца и почек, мальформации легких, генные мутации, хромосомные микроперестройки, молекулярные механизмы, генетическая диагностика, генетическое консультирование

Цель проекта

Оптимизация методов диагностики, включая молекулярно-генетический и высокоразрешающий молекулярно-цитогенетический анализ, при врожденных пороках развития для определения персонализированного подхода к ведению пациентов

Задачи проекта

1. Создать коллекцию образцов периферической крови от группы пациентов с сочетанными пороками сердечно-сосудистой и мочеполовой систем; пациентов с

изолированными или множественными пороками сердечно-сосудистой системы, пищеварительной трубки, скелета, половой системы, умственной отсталостью; коллекцию образцов периферической крови, пораженного и здорового участков легочной ткани пациентов с кисто-аденоматозным пороком развития легкого.

2. Охарактеризовать спектр структурных хромосомных микроперестроек и точечных генных мутаций в группе пациентов с сочетанными врожденными пороками мочеполовой и сердечно-сосудистой системы.

3. Провести скрининг хромосомных структурных микроперестроек в группе пациентов с кисто-аденоматозным пороком развития легкого и провести моделирование выявленных генетических дефектов в модели рыб *Danio Rerio* с применением техники морфолино.

4. Определить генные и хромосомные дефекты у отдельных пациентов с тяжелыми множественными или изолированными пороками сердечно-сосудистой, пищеварительной, половой системы, скелета, умственной отсталостью.

5. Определить взаимосвязь клинических проявлений и течения заболевания от обнаруженных генетических aberrаций.

6. С учетом новых обнаруженных молекулярно-генетических механизмов, разработать алгоритмы медико-генетического консультирования в семьях, имеющих детей с изолированными и сочетанными врожденными пороками сердечно-сосудистой, мочеполовой системы и легких.

Достигнутые результаты проекта

В рамках работ 2017 года (январь-май) было начато формирование когорты пациентов с сочетанными врожденными пороками сердца и почек, выделена ДНК и начата подготовка библиотек. Проведен первый пилотный запуск на образцах ДНК от 2 пациентов и получены предварительные данные о дупликации хромосомного локуса, содержащего ген *MSTR2*; данный ген является ответственным за нормальное функционирование ворсинчатого эпителия и доказано связан с развитием цилиопатий. Также, в исследуемой группе пациентов методом FISH верифицирована делеция 22 хромосомы у пациента без фенотипических признаков синдрома Ди-Джорджи, что подтверждает значение цитогенетических исследований для верификации причин сочетанных врожденных пороков.

Ожидаемые результаты проекта

В результате проекта будут получены новые фундаментальные знания о генетических основах и молекулярно-клеточных механизмах формирования изолированных и сочетанных врожденных пороков развития, главным образом пороков сердечно-сосудистой, мочеполовой, дыхательной систем. Практическими результатами проекта будут являться:

1. Алгоритм генетического и цитогенетического анализа при сочетанных врожденных пороках сердечно-сосудистой и мочеполовой системы;
2. Алгоритм генетического и цитогенетического анализа при сложных изолированных и множественных пороках сердечно-сосудистой, дыхательной, пищеварительной и костно-мышечной систем.

Назначение и предполагаемое использование (внедрение) результатов проекта

Предложенные алгоритмы генетического и цитогенетического анализа могут быть использованы в работе медико-генетических центров и при проведении медико-генетического консультирования. Протоколы клинко-лабораторной диагностики и мониторинга у детей с сочетанными врожденными аномалиями мочеполовой, сердечно-сосудистой и дыхательной систем будут использованы в стационарах

кардиологического, кардиохирургического, нефроурологического и общехирургического профиля.

Описание предлагаемого научного исследования

Исследование является комбинированным (ретроспективным и проспективным). В исследование будут включены пациенты детского возраста с сочетанными или редкими изолированными врожденными пороками развития, проходившие обследование и лечение на базе СЗ ФМИЦ им. В. А. Алмазова. Исследование, главным образом, сфокусировано на врожденных пороках, затрагивающих сердечно-сосудистую, мочеполовую и дыхательную системы, но также будет включать пациентов с другими тяжелыми пороками. Пациентам будет проведено комплексное молекулярно-генетическое и молекулярно-цитогенетическое исследование с помощью современных полногеномных и таргетных (направленных) методов, в том числе сравнительной геномной гибридизации на ДНК-микрочипах (CGH-array), флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH), секвенирования методом Сэнгера и полноэкзомного секвенирования нового поколения. Всем пациентам будет проведено углубленное обследование для верификации аномалий развития систем и органов. Клинико-генетические корреляции будут получены путем сопоставления данных генетического анализа с данными клинического, инструментального и лабораторного обследования с применением новых инновационных и высокотехнологичных методов, включая масс-спектрометрию. Выявленные генетические дефекты будут функционально исследоваться на экспериментальных животных моделях с применением технологии морфолино. Изучение спектра генных/хромосомных aberrаций в группе детей с множественными пороками, а также с редкими изолированными дефектами, открывает перспективу лучшего понимания молекулярных-клеточных механизмов их формирования, выявления новых генов-кандидатов и, как следствие, более полной диагностики и грамотного медико-генетического консультирования семей с целью определения прогноза для пробанд и оценки рисков при последующих беременностях.

Описание научных подходов и методов, используемых для решения поставленных задач

1. Методы клинического обследования пациентов с изолированными или сочетанными пороками развития, включая функциональную диагностику, лучевые методы и методы эндоскопии.
2. Выявление численных и крупных структурных хромосомных перестроек с помощью стандартного кариотипирования по ФГА-стимулированным лимфоцитам крови (метод дифференциального окрашивания хромосом).
3. Полногеномный высокоразрешающий скрининг хромосомных структурных микроперестроек (микроделеций и микродупликаций) с помощью метода сравнительной геномной гибридизации на ДНК-микрочипах (array-CGH). В частности, будут использованы олигонуклеотидные платформы Agilent SurePrint G3 Human CGH Microarray Kit, 8x60K и сканер биочипов SureScan Microarray Scanner (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).
4. Таргетное (направленное) выявление хромосомных aberrаций и верификация aberrаций, обнаруженных методами стандартного кариотипирования и array-CGH, с помощью метода флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH). В частности, будут использованы коммерческие центромероспецифичные и локус-специфичные ДНК-зонды (Abbott/Vysis; Kreatech)
5. Скрининг точечных генетических дефектов с помощью метода полноэкзомного секвенирования нового поколения с применением прибора Illumina HiSeq.

6. Моделирование выявленных генетических дефектов на животных моделях (Danio Rerio) с применением технологии морфолино.
7. Таргетное (направленное) выявление точечных генетических дефектов, а также подтверждение наличия генетических дефектов, обнаруженных методом полноэкзомного секвенирования нового поколения, с помощью метода секвенирования по Сэнгеру на приборе ABI Prism 350.