

Молекулярно-генетические методы исследования в кардиологии. Интерпретация результатов

Выполнила: Усупова А. 785 «ВБ»
Проверила: Садыкова Д.З.

Молекулярно-генетические методы - большая и разнообразная группа методов, предназначенная для выявления вариаций (повреждений) в структуре участка ДНК (аллеля, гена, региона хромосомы) вплоть до расшифровки первичной последовательности оснований. В основе этих методов лежат генно-инженерные манипуляции с ДНК и РНК. Исходным этапом всех молекулярно-генетических методов является получение образцов ДНК.

Этапы исследования

Независимо от выбранного метода молекулярно-генетического исследования, оно будет включать в себя следующие этапы:

- взятие биоматериала, чаще для исследования используют кровь пациента. Полученный материал маркируют и транспортируют в лабораторию;
- выделение ДНК/РНК;
- проведение исследований в соответствии с выбранным методом;
- изучение и интерпретацию результатов; выдачу заключения.

Методы молекулярно-генетической диагностики

Методы молекулярной цитогенетики

Цитогенетический анализ позволяет выявить наследственные заболевания, психические отклонения, врожденные пороки развития. Суть метода — в изучении хромосом с помощью специальных микроматриц, нанесенных на ДНК-чипы. Для этого из образца крови выделяют лимфоциты, которые затем помещают на 48–72 часа в питательную среду и по истечении этого времени исследуют. Назначают такой анализ нечасто, в основном для уточнения диагноза у детей при подозрении на врожденные заболевания. Анализ очень точен, но достаточно трудоемок и длителен (результат можно получить лишь через 20–30 дней после сдачи).

Молекулярная диагностика методом ПЦР

Полимеразная цепная реакция — метод, изобретенный в 1983 году, по сей день самый популярный и фундаментальный в молекулярной диагностике. Характеризуется высочайшей точностью и чувствительностью, а также скоростью проведения исследования. Для анализа выбирают участок ДНК и многократно дублируют его в лаборатории с помощью специальных веществ.

Метод флуоресцентной гибридизации (FISH)

В данном молекулярном методе объектом исследования становятся уникальные нуклеотидные соединения отдельно взятой хромосомы или ее участок. Для этого используются меченые флуоресцентными маркерами короткие ДНК-последовательности (зонды), которые позволяют выявить фрагменты с атипичными генами. Биоматериал для анализа может быть любой, важно, чтобы образец был доставлен в лабораторию сразу после его изъятия. Метод особенно активно используют в пренатальной диагностике (для определения риска развития у плода врожденных пороков), гематологии. FISH-метод очень чувствителен и точен для выявления поврежденных фрагментов ДНК (погрешность около 0,5%), при этом достаточно быстр: результат придется ждать не более 72-х часов. Однако у него есть и недостатки: FISH еще более специфичен, чем микроматричный цитогенетический анализ, и может служить лишь для подтверждения или опровержения предполагаемого диагноза.

Микрочипирование

- Этот метод похож на предыдущий — здесь так же используются меченные флуоресцентом последовательности ДНК. Однако эти зонды сначала выделяют из проб, полученных от пациента, и затем сравнивают с образцами, нанесенными на микрочипы. ДНК-микрочип представляет собой основание (стеклянное, пластиковое, гелевое), на которое может быть нанесено до нескольких тысяч микротестов длиной от 25 до 1000 нуклеотидов. Полученные после очистки биоматериала пробы (зонды) совмещают с микротестами на чипе и наблюдают за реакцией маркёров. Результаты исследования готовы через 4–6 дней после забора материала. Для анализа используется любой биоматериал, из которого можно получить образец ДНК/РНК. Используют такой метод в онкологии и кардиологии (в том числе для изучения генетической предрасположенности), он точен и чувствителен

Применение методов генетической диагностики в кардиологии направлено на изучение причин как моногенной патологии (врожденные нарушения ритма, синдром Марфана, КМП), так и полигенных многофакторных заболеваний (АГ, СД 2-го типа, ИБС).

- В случае **моногенной патологии** генетическая диагностика имеет непосредственное клиническое значение, и определение причинных мутаций генов может повлиять на терапию и прогноз заболевания.

- В случае **полигенных** многофакторных заболеваний генетические исследования направлены в основном на поиск генетических маркеров предрасположенности, модулирующих риск возникновения, особенностей течения и прогноз заболевания, а также ответа на терапию. Данные исследования носят в основном научный характер, и международные рекомендации об их применении в рутинной клинической практике пока отсутствуют. Даже информация о новых генетических маркерах, достоверно ассоциированных с повышенным риском развития ожирения и ИБС, не имеет доказанного клинического значения, поскольку при большинстве полигенных многофакторных заболеваниях вклад традиционных ФР значительно превышает влияние генетических. Несмотря на большой объем фундаментальных исследований, проведенных в этой области, информация о генетических вариантах, предрасполагающих к развитию заболеваний, на сегодняшний день не может и не должна использоваться для клинических целей. Исключения могут составлять только исследования генетических факторов системы гемостаза.

Расширенное исследование генов системы гемостаза: F2, F5, MTHFR, MTR, MTRR, F13, FGB, ITGA2, ITGB3, F7, PAI-1

Различные изменения в генах системы гемостаза и цикла обмена фолатов предрасполагают к развитию большого числа патологических состояний: инфаркты, инсульты, тромбоемболии, кровотечения.

- Профиль включает в себя исследование основных полиморфизмов в генах системы гемостаза и фолатного цикла:

- F2 c.*97G>A (20210 G>A; rs1799963),
- F5 c.1601G>A (Arg534Gln; 1691 G>A; rs6025),
- MTHFR c.665C>T (Ala222Val; 677 C>T; rs1801133),
- MTHFR c.1286A>C (Glu429Ala; 1298 A>C; rs1801131),
- MTR c.2756A>G (Asp919Gly; rs1805087),
- MTRR c.66A>G (Ile22Met; rs1801394),
- F13 c.103G>T (I63T; rs5985),
- FGB c.-467G>A (-455 G>A; rs1800790),
- ITGA2 c.759C>T (Phe253Phe, 807 C>T; rs1126643),
- ITGB3 c.176T>C (Leu59Pro; 1565 T>C; rs5918),
- F7 c.1238G>A (Arg353Gln; 10976 G>A; rs6046),
- PAI-1 (SERPINE1) -675 5G>4G (rs1799889).

- **Ген F2** кодирует аминокислотную последовательность белка протромбина. Полиморфизм F2 с.*97G>A приводит к повышенной экспрессии гена. Клинически неблагоприятный вариант полиморфизма (с.*97A) наследуется по аутосомно-доминантному типу. Наличие полиморфизма F2 с.*97G>A в гомозиготной или гетерозиготной форме значительно увеличивает риск возникновения венозных тромбозов, в том числе тромбозов сосудов мозга и сердца, особенно в молодом возрасте. У пациентов-носителей данного полиморфизма повышен риск развития тромбоэмболий после хирургических вмешательств. Приём оральных контрацептивов у данной группы лиц также увеличивает риск тромбозов (относительный риск развития тромбофилии и венозной тромбоэмболии у гетерозиготных носительниц полиморфизма с.*97G>A возрастает в 16 раз).

- **Ген F5** кодирует аминокислотную последовательность белка проакцелерина - коагуляционного фактора 5. Нуклеотидная замена с.1601G>A («мутация Лейден») приводит к аминокислотной замене аргинина на глутамин в позиции 534, что придает устойчивость активной форме проакцелерина. Клинически это проявляется рецидивирующими венозными тромбозами и тромбоэмболиями. Наличие полиморфизма в гомозиготной или гетерозиготной форме значительно (в 3 и более раз, а на фоне заместительной гормонотерапии или приема оральных контрацептивов - в 30 и более раз) увеличивает риск венозных тромбозов. Риск инфаркта миокарда увеличивается в 2 и более раз, риск развития патологии беременности (прерывание беременности, преэклампсия, хроническая плацентарная недостаточность и синдром задержки роста плода) увеличивается в 3 и более раз.
- Также, пациенты, являющиеся одновременно носителями полиморфизма с.*97G>A гена протромбина и «мутации Лейден», еще в большей степени подвержены риску развития тромбозов и тромбоэмболий.

- **Ген MTHFR** кодирует аминокислотную последовательность фермента метилентетрагидрофолатредуктазы, играющего ключевую роль в метаболизме фолиевой кислоты. Полиморфизм с.665С>Т гена MTHFR связан с заменой нуклеотида цитозина (С) на тимин (Т), что приводит к аминокислотной замене аланина на валин в позиции 222. Вариант с.665Т связан с четырьмя группами мультифакториальных заболеваний: сердечно-сосудистыми, дефектами развития плода, колоректальной аденомой и раком молочной железы и яичников. У женщин с генотипом с.665Т/Т дефицит фолиевой кислоты во время беременности может приводить к порокам развития плода, в том числе незаращению нервной трубки.

-
- **Ген MTR** кодирует аминокислотную последовательность фермента метионин синтазы. Полиморфизм с.2756A>G связан с аминокислотной заменой (аспарагиновой кислоты на глицин) в молекуле фермента. В результате этой замены функциональная активность фермента изменяется, что приводит к повышению риска формирования пороков развития у плода. Влияние полиморфизма усугубляется повышенным уровнем гомоцистеина.

- **Ген FGB** кодирует β -цепь фибриногена, являющегося предшественником фибрина. Аллельный вариант с.-467A обуславливает усиленную транскрипцию гена и может приводить к увеличению уровня фибриногена в крови и повышению вероятности образования тромбов при наличии дополнительных факторов риска. Гетерозиготный вариант с.-467G/A связывают с повышенным риском ишемического инсульта и лакунарными инфарктами церебральных сосудов. Гомозиготный вариант с.-467A/A связывают с повышенным риском инфаркта миокарда.

- **Ген гликопротеина Gp1a (ITGA2)** кодирует синтез альфа-2-субъединицы интегринов – специализированных рецепторов тромбоцитов. Аллельный вариант с.759Т вызывает изменение первичной структуры субъединицы и свойств рецепторов. При гетерозиготном (с.759С/Т) варианте отмечается увеличение скорости адгезии тромбоцитов к коллагену I типа, что может приводить к повышенному риску тромбофилии, инфаркта миокарда и других сердечно-сосудистых заболеваний. Аллельный вариант с.759Т связывают со случаями резистентности к аспирину. Помимо этого, при гомозиготном (с.759Т/Т) варианте значительно увеличивается количество рецепторов на поверхности тромбоцитов. В совокупности, при гомозиготном варианте данного полиморфизма значительно повышен риск тромбофилии, инфаркта миокарда и развития других острых эпизодов тромбообразования в возрасте до 50 лет, даже по сравнению с гетерозиготным вариантом.

- **Ген гликопротеина Gp3a (ITGB3)** кодирует синтез бета-3 цепи интегринового комплекса GP2b\3a, участвующего в разнообразных межклеточных взаимодействиях (адгезии и сигнализации).
- Аллельный вариант с.176С (гетерозигота с.176Т/С) обуславливает повышенную адгезию тромбоцитов и может приводить к увеличению риска развития острого коронарного синдрома, а также связан с синдромом привычного невынашивания беременности. Гомозиготный вариант с.176С/С обуславливает повышенную адгезию тромбоцитов и может приводить к значительному увеличению риска развития острого коронарного синдрома в возрасте до 50 лет. У лиц с полиморфными аллельными вариантами часто отмечается пониженная эффективность аспирина.

-
- **Аллельный вариант с.1238А** (гетерозигота с.1238G/А и гомозигота с.1238А/А) гена F7 приводит к понижению экспрессии гена и снижению уровня фактора 7 в крови, рассматривается как протективный маркёр в отношении развития тромбозов и инфаркта миокарда.

- **Ген фибриназы (F13)** кодирует синтез трансглутаминазы, участвующей в стабилизации фибринового сгустка и в формировании соединительной ткани. Аллельные варианты с.103G/T и с.103T/T приводят к снижению уровня трансглутаминазы с образованием сетчатой структуры фибрина с более тонкими волокнами, меньшими порами, и изменением характеристик проникновения, которое в сочетании с другими факторами риска ассоциируется с возможным риском внутричерепных кровоизлияний и кровотечений из внутренних органов, а также привычным невынашиванием беременности. При этом аллельный вариант с.103T может выступать в роли протективного фактора в отношении инфаркта миокарда и венозных тромбозов.



-
- **ДНК-методы** позволяют не только диагностировать генные болезни, но и выявлять бессимптомных гетерозиготных носителей мутаций и, таким образом, вести эффективную профилактику болезней в семьях высокого риска [4].
 - В целом проблему ДНК-диагностики генных болезней, равно как и хромосомных, по сути можно считать принципиально решенной. Ее дальнейший прогресс может касаться не только увеличения числа диагностируемых болезней, но и переноса основной тяжести исследований в ранний постнатальный период для скринирования новорожденных на предрасположенность к мультифакториальным (полигенным) заболеваниям, таким, как атеросклероз, ишемия сердца, диабет, некоторые опухоли и нервно-психические заболевания.

- В настоящее время известно более 50 мутаций, ассоциированных с ГКМП, обнаруженных в локусах генов, кодирующих структуру и функцию сократительных белков миокарда. Генный дефект заключается в нарушении последовательности аминокислот или в замене одной аминокислоты на другую. Впервые аномальный ген ГКМП, локализующийся на 14-й хромосоме и получивший название FHC-1 (ген семейной гипертрофической кардиомиопатии), удалось идентифицировать J. Jarcho и соавт. в 1989 г. [3]. Наиболее частыми при ГКМП являются мутации гена тяжелых цепей β -миозина, гена сердечного тропонина T, гена α -тропомиозина и гена белка C, связывающего миозин [12] (табл. 1).

Основные генетические детерминанты ГКМП [12]

Таблица 1

65–85% всех мутаций	15–20% всех мутаций
Тяжелая цепь β -миозина ~35–45%	Легкие цепи миозина — эссенциальная и регуляторная
Миозин-связывающий белок C ~15–20%	
Тропонин T ~15–20%	α -тропомиозин
	α -актинин
	Сердечный тропонин I
	Тяжелая цепь α -миозина
	Титин
	Тропонин C

Таблица 2

Известные генетические формы гипертрофической кардиомиопатии и их представленность в группе больных с идентифицированными мутациями (при полном скрининге генов) [14, 17, 18]

Форма	Ген	Лocus	Белок	Структура	Частота, %
HCM1	MYH7	14q12	Тяжелая цепь β -миозина	Миофиламенты	> 30
HCM2	TNNT2	1q32	Тропонин T2	Миофиламенты	15
HCM3	TRPM1	15q22	Тропомиозин- α скелетных мышц	Миофиламенты	< 5
HCM4	MYBPC3	11p11.2	Миозин-связанный C-белок	Миофиламенты	> 15
HCM5	MYLK2	20q13	Киназа легкой цепи миозина	Миофиламенты	< 1
HCM6	PRKAG2	7q36	AMP-киназа γ 2	Ca ²⁺ обмен	< 1
HCM7	TNN13	19q13	Сердечный тропонин I	Миофиламенты	10
HCM8	MYL3	3p21.3	Легкая цепь-1 миозина, B	Миофиламенты	< 1
HCM9	TTN	3q21	Тит	Миофиламенты	< 1
HCM10	MYL2	12q23	Регуляторная цепь миозина	Миофиламенты	< 5
HCM11	ACTG1	15q14	α -актинин	Миофиламенты	< 1
HCM12	CSRP3	11p15	Сердечный LIM-содержащий белок	Z-диски	< 1
HCM13	TNNC1	3p21	Сердечный тропонин C	Миофиламенты	< 1
HCM14	MYH6	14q11	Тяжелая цепь миозина 6	Миофиламенты	< 1
HCM15	VCL	10q21	Винкулин	Z-диски	< 1
HCM16	LDB3	10q22	LIM-связывающий домен 3	Z-диски	1-5
HCM17	MYOZ2	4q26	Миозенин 2	Z-диски	< 1
HCM18	JPH2	20q12	Юктофилин	Ca ²⁺ обмен	< 1
HCM19	PLN	6q22	Фосфоламбан	Ca ²⁺ обмен	< 1
HCM20	CALR3	19q13	Кальретикулин 2	Ca ²⁺ обмен	< 1
HCM21	NEXN	1p31	Нексилин-подобный белок	Z-диски	< 1
HCM22	TCAP	17q12	Телетонин	Z-диски	< 1
HCM23	MYPN	10q21	Миопалладин	Z-диски	< 1
HCM24	ACTN2	1q42	Δ -актинин 2	Z-диски	< 1

- Молекулярно-генетические методы исследования были признаны **«золотым стандартом»** диагностики гипертрофической кардиомиопатии, так как генетические мутации определяют **фенотип**, включая клинику начала болезни, так и особенности течения, **вероятность жизнеугрожающих аритмий**, неблагоприятного исхода и, следовательно, **персонализированный подход к стратегии ведения пациента**. При полном скрининге всех известных генов, ответственных за развитие ГКМП, в 60% семейных случаев удастся выявить соответствующие мутации. Аналогичный объем исследований у больных со спорадическими формами ГКМП позволяет установить молекулярную причину заболевания не более чем у 30% членов семьи

-
- <https://www.invitro.ru/analizes/for-doctors/841/21921/>
 - www.kp.ru/guide/molekuljarnaja-diagnostika.html