

О. П. Обухович

МЕТОДОЛОГИЯ ДИАГНОСТИКИ СИНДРОМА РЕТТА

Научный руководитель: канд. биол. наук, доц. Е. В. Чаплинская

Кафедра биологии,

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

Резюме. В работе подробно изучены и описаны методы молекулярно-цитогенетической диагностики синдрома Ретта. Определены преимущества и недостатки методов, применяемых в Беларуси и в ближнем зарубежье.

Ключевые слова: Синдром Ретта, верификация, диагностика

O. P. Obuhovich

METHODOLOGY OF RETT'S SYNDROME DIAGNOSTICS

Tutor: associate professor E. V. Chaplinskaya,

Department of Biology,

Belarusian State Medical University, Minsk

Resume. The methods of molecular-cytogenetic diagnostics of Rett's syndrome have been thoroughly studied and described in the work. The advantages and disadvantages of the methods used in Belarus and in the near abroad are determined.

Keywords: Rett's syndrome, verification and diagnostics of Rett's syndrome.

Актуальность. Синдром Ретта (РТТ) представляет собой сложный комплекс симптомов, характеризующих структурные и функциональные нарушения со стороны многих систем органов, однако в первую очередь, со стороны центральной нервной системы. РТТ служит одной из ведущих причин умственной отсталости у девочек. Поскольку ведущим проявлением синдрома Ретта являются существенные нарушения в сфере социализации и коммуникации, РТТ является одним из социально значимых синдромов. Диагноз синдрома Ретта в настоящее время основывается, главным образом, на выявлении типичной клинической картины. При этом, классическая форма синдрома Ретта может быть диагностирована, только если пациент имеет все необходимые диагностические критерии.

В связи с вышесказанным, можно выделить несколько актуальных проблем. Во-первых, оценка некоторых из обязательных критериев для диагностики РТТ носит субъективный характер. Во-вторых, в зависимости от локализации и вида мутаций в гене MeCP2 тяжесть проявления симптомов может варьировать. В-третьих, существуют так называемые атипичные формы синдрома Ретта, при которых в анамнезе присутствуют не все обязательные критерии. Поэтому диагноз, основанный только на оценке клинического течения болезни, можно считать лишь предварительным. Таким образом, в настоящее время актуален вопрос молекулярно-генетической диагностики синдрома Ретта с целью верификации диагноза.

Цель: изучение и анализ существующих методов диагностики синдрома Ретта (РТТ), применяемых в России и в Беларуси.

Материал и методы. Анализ протоколов методов диагностики синдрома Ретта, размещенных на официальных доступных базах данных: MLPA.com [1], база данных института общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН [3], RettBase IRSA [2]; электронном ресурсе www.dslib.net [4], а также на официальном сайте научного центра психического здоровья РАМН [5], описывающих каждый из вариантов методов диагностики синдрома Ретта.

Результаты и их обсуждение. В настоящее время в клинической практике используют три основных направления диагностики РТТ:

- Установление спектра мутаций гена MeCP2, его влияние на нарушение функций одноименного белка.
- Анализ особенностей X-инактивации у пациентов с РТТ и их родителей.
- Исследование характера репликации хромосомы X.

Для проведения как цитогенетических, так и молекулярно-генетических исследований для диагностики синдрома Ретта можно использовать ДНК клеток различных тканей, поддающихся биопсии. Однако наиболее распространенным материалом для анализа служат лимфоциты цельной периферической крови.

Одним из существенных факторов, определяющих генез РТТ, является особый тип репликации хромосомы X в интерфазу мейоза I. Первым этапом определения времени репликации хромосомы X является иммуноокрашивание клеточной культуры. Далее следует РНК-FISH анализ, который проводится с флуоресцентно мечеными ВАС-клонами. Детекция времени репликации X-хромосомы производится с использованием 5-бромо-2-дезоксиуридина (Brd U). Идентификацию X-хромосомы производят с помощью FISH-анализа. Для сравнения степени компактизации двух X-хромосом используют оригинальную авторскую компьютерную программу, специально разработанную в институте общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН.

Исследование X-инактивации проводится с помощью анализа статуса метилирования фланкирующих участков экспансии (ЦАГ), повторов гена HUMARA (ген антропогенного рецептора человека). Участок хромосомы X, содержащий этот ген больше других подвержен X-инактивации, поскольку представляет собой консервативную последовательность, следовательно, может служить маркером X-инактивации и использоваться для диагностики. Следует отметить, что сдвиг инактивации, как правило, происходит в сторону отцовской хромосомы X (у 65%-73% случаев). Общая эффективность данной методики для верификации синдрома Ретта составляет 89,6%.

Поиск точковых мутаций гена MeCP2 осуществляется согласно общепринятому протоколу MLPA® General Protocol. MLPA является разновидностью ПЦР, которая предусматривает амплификацию нескольких цепей с только одной парой праймеров. Каждый зонд, применяемый в данной реакции состоит из двух олигонуклеотидов, которые распознают соседние целевые сайты на ДНК. Один зонд содержит олигонуклеотидную последовательность, узна-

ваемую прямым праймером, а другой содержит последовательность, узнаваемую обратным праймером. Только тогда, когда оба зонда-олигонуклеотиды комплементарно связываются с соответствующим фрагментом ДНК, они могут быть лигированы в полный зонд. Поскольку каждый зонд имеет определенную уникальную длину, то полученные ампликоны могут быть разделены и идентифицированы методом капиллярного электрофореза. Сравнивая пик картину, полученную в эксперименте с эталонной, можно определить относительное количество каждого ампликона. Мутации гена MeCP2 находят у большинства пациентов с синдромом Ретта (35-80%). Но необходимо отметить, что доля молчащих мутаций среди других видов мутаций гена составляет 6,93%, поэтому, многие изменения гена MeCP2 не могут рассматриваться как диагностические для синдрома Ретта. Для использования данного метода необходим подробный анализ мутационной изменчивости гена MeCP2 при РТТ. Несмотря на наличие публикаций, характеризующих мутации гена, на современном этапе известны лишь восемь рекуррентных мутаций. Показано, что спектр мутации гена MeCP2 весьма разнообразен, а представленный метод учитывает лишь точковые мутации. Кроме того, не известна причина развития синдрома у пациентов, не имеющих мутацию в гене. Перечисленные выше обстоятельства усложняют использование данного метода в диагностике РТТ.

Заключение.

- Исследование характера репликации хромосомы X у пациентов с синдромом Ретта является перспективным направлением, поскольку данный метод сравнительно удобен в использовании, однако не может быть использован как основной метод диагностики. В настоящее время используется в России, в РБ не применяется.

- Поиск точковых мутаций гена MeCP2 осуществляется в лаборатории цитогенетических, молекулярно-генетических и морфологических исследований РНПЦ «Мать и дитя». Данный метод весьма дорогостоящий и трудоемкий, при этом, весьма специфичен и зачастую не может гарантировать верификацию синдрома Ретта.

- Анализ характера X-инактивации является наиболее оптимальным методом диагностики синдрома Ретта на сегодняшний день, поскольку явление инактивации хромосомы X встречается у большинства пациентов с РТТ и их родителей. Кроме того, определение преимущественно инактивированной хромосомы позволит прогнозировать дальнейшие случаи синдрома Ретта в семье.

Информация о внедрении результатов исследования. По результатам настоящего исследования опубликовано 7 статей в сборниках материалов, 4 тезисов докладов, получено 2 акта внедрения в образовательный процесс (кафедра биологии БГМУ в 2005/2016 и 2016/2017 учебном годах).

Литература

1. Multiplex ligation-dependent probe amplification [Электронный ресурс]/ MLPA.- Электрон. дан. и прогр .- Режим доступа: <http://www.MLPA.com>. (дата обращения: 25.12.15).
2. RettBase [Электронный ресурс]/ MECP2 Mutation Data Form.-MeCP2 Mutation Data-base.- Режим доступа: <https://www.rettbase.com>.(дата обращения: 25.09.14).
3. База данных института общей генетики им. Вавилова РАН [Электронный ресурс] / ИОГ им. Вавилова. – Электрон. дан. и прогр. – Режим доступа к ресурсу: <http://www.psychiatry.ru/epigenetic/> (дата обращения: 06.09.2016).
4. Диссертации России [Электронный ресурс] /Диссертации и авторефераты. – Электрон. дан. и прогр. – Режим доступа к ресурсу: <http://www.dslib.net> (дата обращения: 10.10.2016).
5. Официальный сайт Научного центра психического здоровья Российской академии медицинских наук [Электронный ресурс]/ НЦПЗ РАМН.- Режим доступа: <http://www.rettssyndrome.org>. (дата обращения: 25.09.14).