

TO'LIQ EKZOMNI SEKVENTSIYALASH USULINING QIZILO'NGACH ATREZIYASI KOMPLEKS DIAGNOSTIKASIDAGI IMKONIYATLARI

Eshkabilov Sh.D.

Bolalar milliy tibbiyot markazi, Toshkent

РЕЗЮМЕ

Цель исследования – оценить диагностические возможности метода полного экзомного секвенирования (Whole Exome Sequencing, WES) в совершенствовании диагностики АП.

Материал и методы. Молекулярно-генетический анализ проведен у детей основной группы и группы сравнения. Исследование WES выполнено на платформе DNBSEQ-G50RS, а полученные данные проанализированы с использованием программного обеспечения SEQ Platform v8.2.0. Выявленные генетические варианты оценивались в сопоставлении с клиническими данными.

Результаты показали, что метод WES обладает высокой диагностической ценностью для выявления патогенных и вероятно патогенных вариантов, связанных с АП, а также синдромальных форм и сопутствующих генетических заболеваний. Метод позволил эффективно идентифицировать клинически значимые мутации.

Заключение. Полное экзомное секвенирование является эффективным диагностическим инструментом для совершенствования диагностики АП, изучения её молекулярно-генетических основ и стратификации пациентов.

Ключевые слова: атрезия пищевода, полное экзомное секвенирование, WES, молекулярно-генетическая диагностика.

Qizilo'ngach atreziyasi (QA) tug'ma rivojlanish anomaliyasi bo'lib, har 3000-4500 tirik tug'ilgan chaqaloqlardan 1 tasida aniqlanadi va 55% hollarda boshqa organlar va tizimlarning nuqsonlari bilan birga uchraydi. Qo'shma anomaliyalar QA bilan operatsiya qilingan bolalarda o'lim va nogironlik xavfini oshiradi [4]. Shuningdek, adabiyotlarda xamroh anomaliyalar orasida ko'plab genetik o'zgarishlar uchrashi keltirilgan. Boshqa nuqsonlar (sindromik shakli) bilan uchraydigan QA li bemorlarda ular birgalikda genetik sindrom yoki assotsiatsiyaning tashkil qilishi mumkin. Zamonaviy molekulyar-genetik tekshiruv usullari esa ushbu nuqson va qo'shimcha anomaliyalarning genetik kodini ochish imkoniyatini beradi.

XX asrning ilmiy-texnik yutuqlari biologiya va tibbiyot sohasidagi zamonaviy tadqiqotlarning imkoniyatlari haqidagi tasavvurlarni tubdan o'zgartirdi. Hozirda guvoh bo'layotgan inqilobiy o'zgarishlar, jumladan, 1953-yilda DNK tuzilishi ochilishi bilan bog'liq edi. 1983-yilda kashf etilgan polimeraz zanjirli

SUMMARY

Objective. To evaluate the diagnostic potential of whole exome sequencing (WES) in improving the diagnosis of esophageal atresia (EA).

Material and methods. Molecular genetic analysis was performed in children from the main and comparison groups. WES was carried out using the DNBSEQ-G50RS platform, and the obtained data were analyzed using SEQ Platform v8.2.0 software. Identified genetic variants were evaluated in correlation with clinical findings.

The results demonstrated that WES has high diagnostic value in detecting pathogenic and likely pathogenic variants associated with EA, as well as syndromic forms and concomitant genetic disorders. The method enabled effective identification of clinically significant mutations.

Conclusion. WES is an effective diagnostic tool for improving EA diagnosis, elucidating its molecular genetic basis, and stratifying patients according to their genetic characteristics.

Keywords: esophageal atresia, whole exome sequencing, WES, molecular genetic diagnosis.

reaksiyasi (PZR) kabi yangi texnologiyalarning paydo bo'lishi DNKni o'rganishga bo'lgan yondashuvni, va shunga mos ravishda sut emizuvchi organizmlar genlarini tahlil qilish usullarini o'zgartirdi. 1977-yilda DNK sekvensiyasi usullari haqida ikki asosiy maqola nashr etilgan edi [3, 4]. F. Sanger va hamkorlari tomonidan taklif etilgan usul [4] keyinchalik takomillashtirildi va hozirgi kunda tadqiqot amaliyoti hamda klinik tashxisda DNK sekvensiyalashning «oltin standarti» sifatida qo'llanilmoqda. Mazkur usul asosida ishlaydigan dastlabki yuqori samarali sekvenatorlar mashhur 13 yillik «Inson genomi» loyihasida qo'llanilgan edi [5].

Ommaviy parallel sekvensiyalash (OPS) uchun bir qator tijorat platformalarining paydo bo'lishi bilan sekvensiyalash narxi pasaya boshladi. 2005-yilda birinchi bo'lib bozorda pirosekvensiyalash texnologiyasi asosida ishlaydigan «454 Life Sciences» («Roche») kompaniyasining GS20 sekvenatori paydo bo'ldi. Bu platforma tadqiqotchilar uchun genom DNKsini yuqori samarada tahlil qilish davrini ochdi. Bunday usullar

Ushbu maqolamizda WES texnologiyasining klinik amaliyotda, xususan, qizilo'ngach atreziyasida hamrohlikda uchraydigan qo'shimcha genetik kasalliklarni tashxislashdagi qo'llanilishi muhokama qilinadi [1].

- Asosiy guruh – og'ir tug'ma irsiy kasalliklarga chalingan bemorlar.



• Qiyoslash guruhi – irsiy kasalliklar borligi aniqlangan oilalarning klinik jihatdan sog'lom bolalari.

• Nazorat guruhi – irsiy kasalliklarga moyillik bo'lmagan oilalarning sog'lom bolalari.

Asosiy guruhdagi irsiy kasalligi bor bemorlar orasida QA bilan tug'ilgan bolalar 6 nafarni va qiyoslash guruhi orasida ularning oila a'zolari 5 nafarni tashkil etdi.

NGS asosidagi texnologiya asosiy guruh va qiyoslash guruhidagi bolalarning klinik holati yoki oilaviy anamnezi bilan bog'liq genetik variantlarni aniqlash uchun qo'llanildi. DNBSEQ-G50RS qurilmasi orqali sekvensiyalash natijasida olingan ma'lumotlar qattiq diskka saqlandi. Har bir namuna uchun to'liq ekzom sekvensiyasi -WES 10 GB ma'lumot beradi. WES ma'lumotlari bioinformatika dasturi SEQ Platform v8.2.0 ga yuklanadi (<http://seq.genomize.com>) (1-rasm). SEQ platformasi WES ma'lumotlari sekvensiyalangan hududlaridagi variantlarni (bir patsiyentga taxminan 200 000 variant) aniqlaydi va ularni bemorning klinik holati yoki sog'lom ishtirokchilarning oilaviy anamnezi bilan uzviy bog'liq holda tahlil qiladi.

NATIJALAR VA MUHOKAMA

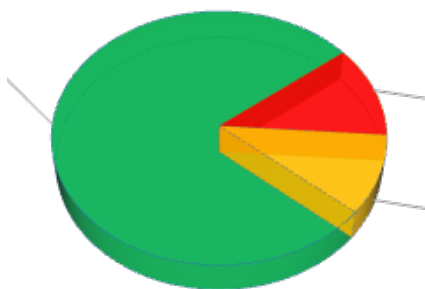
Jami tadqiqot ishtirokchilarining guruhlariga taqsimlanishi ko'rsatganidek, asosiy guruhdagilar - 235 nafar (78,3%), taqqoslash guruhidagilar 30 nafar (10%) va nazorat guruhidagilar esa 35 nafarni (11,7%) tashkil etdi (2-rasm). Ular orasida QA bilan tug'ilgan bemorlar va ularning yaqin qarindoshlari 11 nafar (4.7%) ni tashkil etdi.

Jins bo'yicha taqsimlash umumiy olganda, tekshirilganlarning 57% o'g'il bolalar va 43% qiz bolalarni tash-

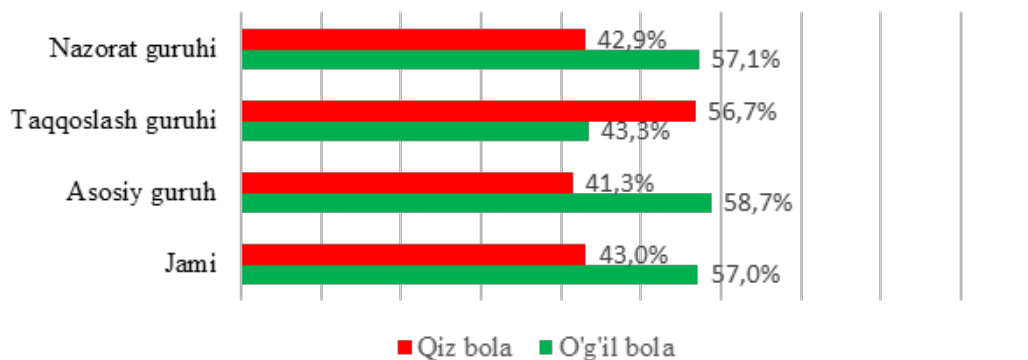
kil etdi. Asosiy guruhda 58,7% o'g'il bolalar va 41,3% qiz bolalar, taqqoslash guruhida 43,3% o'g'il bolalar va 56,7% qiz bolalar, nazorat guruhida esa 57,1% o'g'il bolalar va 42,9% qizlar bo'lgan (3-rasm).

Tadqiqotning laborator bosqichi to'plamda tavsiya etilgan optimal sharoitlarda amalga oshirildi va olingan xom ashyo bir qator jarayonlardan o'tib tahlilga tayyorlandi. Tahlillar davomida variantlarni talqin qilish uchun turli ma'lumotlar bazalarining joriy versiyalari (Human Genome hg19/GRCh37, RefSeq (release 61), dbSNP (v147), 1000 Genomes phase3, gnomAD, ExAC03) ishlatildi. Kichik allele chastotasi (1000 Genom, ExAC, va gnomAD ma'lumotlar bazalarida) 5% dan yuqori bo'lgan mutatsiyalar inobatga olinmagan.

Aniqlangan variantlar 2015-yilda chop etilgan ACMG (Amerika tibbiy genetik va genomika kolleji) mezonlari bo'yicha tasniflandi. (PMID: 25741868) Tahlillar natijasida bemorning klinikasi bilan bog'liq patogen, ehtimol patogen va klinik jihatdan noma'lum variantlar haqida ma'lumotlar olindi. Bundan tashqari, bemorning klinikasi bilan bog'liq bo'lmasa ham, ACMG tomonidan ma'lumot berilishi tavsiya etilgan genlarda aniqlangan patogen va ehtimol patogen variantlar hisobotga qo'shilgan. (PMID: 34012068). Bundan tashqari, hisobotda boshqa autosomal retsessiv kasalliklar bilan bog'liq variantlar haqida xabar berilmagan. Bemorning ekzomi ma'lumotlari laboratoriyamizda saqlanadi va bemor nikohdan oldin retsessiv kasalliklarning tashuvchisi holati aniqlanganda yoki yangi ko'rsatkich paydo bo'lgan taqdirda tahlil qilish uchun murojaat qilishi mumkin bo'ladi.



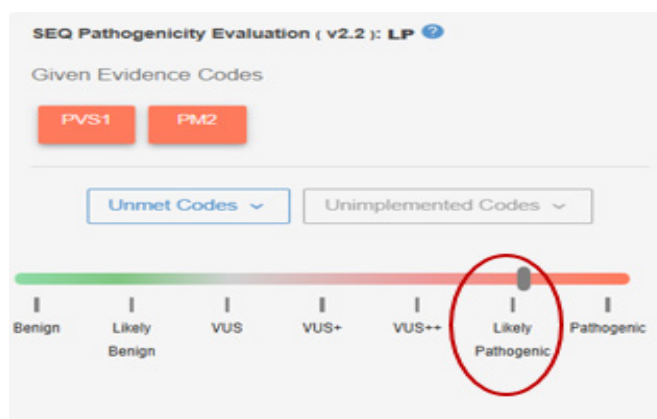
2-rasm. Klinik guruhlar bo'yicha tekshirilganlarning taqsimoti.



3-rasm. Jinsi bo'yicha taqsimlanishi.

Sinov natijasida olingan ma'lumotlar bemor, oila tarixi va boshqa laboratoriya ma'lumotlari tomonidan bizga xabar qilingan klinik ma'lumotlarga muvofiq tahlil qilindi. To'g'ri molekulyar tashxis qo'yish uchun to'liq klinik tekshiruv, oila tarixi, radiologik va biokimyoviy qo'shimcha tekshiruvlar talab qilinishi mumkin. Anamnez shaklidagi ma'lumotlar noto'g'ri yoki to'liq bo'lmasa, natijalar noto'g'ri talqin qilinishi mumkin.

Olingan natijalar klinik ma'lumotlarga mos kelmasa, ularni boshqa barcha testlar bilan birgalikda baholash orqali qo'shimcha tahlillar talab qilinishi mumkin. Yangi avlod sekvensiya texnologiyasidan foydalangan holda ekzon ketma-ketligi faqat ekzon va ekzon-intron birikmalarini qamrab oladi. Sinonim variantlari va chuqur intron variantlari, agar adabiyotda patologik variant haqida xabar berilmagan bo'lsa, istisno qilinadi.



4-rasm. Genlar patogenligi bo'yicha SEQ Platform v8.2.0 platformasida tasniflanishi.

Amerika tibbiy genetik va genomika kollejining ikkinchi darajali topilmalarni saqlash ishchi guruhi (SFWG) tomonidan yangilangan ACMG SF v3.0 ro'yxatiga kiritilgan genlarda patogen bo'lmagan/ehtimol patogen o'zgarishlar yangi avlod sekvensiyalash (NGS) usulida aniqlangan taqdirda inobatga olish va xulosada keltirish tavsiya etiladi. Yuqoridagi tavsiyalarga asoslangan holda bizning QALi bemorlarimiz va ularning

yaqin qarindoshlari orasida uchragan patogen, ehtimol patogen va patogenligi noma'lum bo'lgan genlar tahlil qilindi (4-rasm).

O'tkazilgan tahlillar shuni ko'rsatadiki, 6 nafar QA bilan tug'ilgan bemorlarimizda ACMG (Amerika tibbiy genetik kolleji) tasnifi bo'yicha patogenligi turli xil bo'lgan jami 21 ta gen aniqlandi (1-jadval).

1-jadval

Qizilo'ngach atreziyasi bilan tug'ilgan bemorlarda aniqlangan genetik o'zgarishlar

Gen (Transkript)	Joylashuvi	Zigotaligi	Kasallik	Irsiylanishi*	Tasnifi**
C7 (NM_000587)	Intron 4 Chr5:40936439	Geterozigot	C7 yetishmovchiligi	AR	Patogen (PVS1, PM2, PM3, PP5)
DNAH5 (NM_000587)	Exon 49 Chr5:13793819	Geterozigot	Tsiliar diskineziya, situs inversus bilan birga yoki alohida	AR	Patogen (PVS1, PM2, PM3, PP5)
EYS (NM_001142800)	Exon 32 Chr6:64791763	Geterozigot	To'r parda pigmentli distrofiyasi	AR	Ehtimol patogen (PM2, PM3, PP1, PP5)
GRK1 (NM_002929)	Exon 7 Chr13:114438250	Geterozigot	Oguchi kasalligi	AR	Patogen (PVS1, PM2, PM3, PP5)
PIEZO1 (NM_001142864)	Exon 38 Chr13:88788060	Geterozigot	Limfatik malformatsiya	AR	Patogen (PVS1, PM2, PS4, PP5)
MYCN (NM_005378)	Intron 2 Chr2:16082979	Geterozigot	Feyngold sindromi	AD	Patogenligi noma'lum (VUS) (PM2, PP3)
COL1A1 (NM_000088)	Exon 48 Chr17:48264127	Geterozigot	Tugallanmagan osteogenez	AD	Patogenligi noma'lum (VUS) (PM2, PP2, PP3)
ACADSB (NM_001609)	Exon 4 Chr10:124800121	Geterozigot	2-metilbutilglitsinuriya	AR	Patogen (PM2, PM3, PS3, PP5)
MPZL2 (NM_005797)	Exon 2 Chr11:118133651	Geterozigot	Karlik	AR	Patogen (PVS1, PM2, PM3, PP5)
CLDN11 (NM_005602)	Exon 2 Chr3:170140971	Geterozigot	Gipomiyelinlovchi leykodistrofiya	AD	Patogenligi noma'lum (VUS) (PM2, PP3)

AGL (NM_000642)	Exon 30 Chr1:100379113	Geterozigot	Glikogen to'planish kasalligi	AR	Patogen (PVS1, PM2, PM3, PP5)
SBDS (NM_016038)	Intron 2 Chr7:66459197	Geterozigot	Shvaxman-Daymond sindromi	AR	Patogen (PVS1, PM2, PP5)
SLC4A11 (NM_001174089)	Exon 5 Chr20:3214819	Geterozigot	Korneal endotelial distrofiya	AR	Patogen (PVS1, PM2, PM3, PP5)
TBX3 (NM_005996)	Exon 6 Chr12:115112201	Geterozigot	Ulnar- mammar sindrom	AD	Patogenligi noma'lum (VUS) (PM2)
HNRNPA2B1 (NM_002137)	Intron 6 Chr7:26236174	Geterozigot	Okulofarengal mushak distrofiyasi	AD	Patogenligi noma'lum (VUS) (PM2, PP3)
BTD (NM_001370658)	Exon 4 Chr3:15686693	Geterozigot	Biotinidaza yetishmovchiligi	AR	Patogen (PM1, PM5, PP5)
RPGRIP1L (NM_015272)	Intron 21 Chr16:53671606	Geterozigot	Juber sindromi 7 / Mekkel sindromi 5	AR	Patogen (PVS1, PM2, PP5)
TBCE (NM_003193)	Intron 2 Chr1:235543465	Geterozigot	Kenni – Kaffi sindromi, 1 tip	AR	Patogen (PVS1, PM2, PM3, PP5)
SQSTM1 (NM_003900)	Exon 8 Chr5:179263501	Geterozigot	Frontotemporal dementsiya va/yoki lateral amiotrofik skleroz	AD	Ehtimol patogen (PM2, PP3, PS3, PS4, PP5)
GJB2 (NM_004004)	Exon 2 Chr13:20763394	Geterozigot	Karlik	AR	Patogen (PVS1, PM2, PM3, PP5)

*AR –autosom-retsessiv, AD-autosom-dominant

** ACMG (Amerika tibbiy genetika kolleji) ko'rsatmalariga muvofiq tasniflangan (Richards et al. 2015, Tayoun et al. 2018).

14 (66,7%) tasi patogen gen, 2 (9,5%) tasi ehtimol patogen va 5 tasi (23,8%) patogenligi noma'lum gen sifatida tasniflangan. Ularning barcha geterozigot holatida bo'lib, irsiylanishiga ko'ra 15 (71,4%) tasi autosom-retsessiv holatda bo'lsa, 6 tasi (28,6%) autosom dominant ekanligi aniqlangan. Undan tashqari, aniqlangan genlarning 71,4% (15/21) ekzonlarda va 28,6% (6/21) intronlarda joylashganligi ma'lum bo'ldi. QA bemorlarning yaqin qarindosh (aka-uka, opa-singil) larida o'tkazilgan WES

genetik tekshiruvi natijasida patogenligi turli xil bo'lgan jami 9 ta gen aniqlandi (2-jadval). Ulardan, barchasi geterozigot holatda, 5 (55,6%)tasi autosom-dominant va 4 tasi (44,4%) autosom-retsessiv holatda irsiylangan bo'lsa, ACMG tasnifi bo'yicha 4 tasi (44,4%) patogen (R) va 5 (55,6%)tasi patogenligi noaniq (VUS+/ VUS++) genlar ekanligi ma'lum bo'ldi. Shuningdek, bu guruhdagi genlarning 77,8% (7/9) ekzonlarda va 22,2% (2/9) intronlarda joylashuvi aniqlandi.

2-jadval

QA bemorlarining yaqin qarindoshlarida aniqlangan genetik o'zgarishlar

Gen (Transkript)	Joylashuvi	Zigotaligi	Kasallik	Irsiylanishi*	Tasnifi**
TBX3 (NM_005996)	Exon 6 Chr12:115112201	Geterozigot	Ulnar- mammar sindrom	AD	Patogenligi noma'lum (VUS) (PM2)
RPS19 (NM_001022)	Exon 5 Chr19:42373774	Geterozigot	Daymond Blekfan anemiyasi	AD	Patogenligi noma'lum (VUS) (PM2, PM5, PP2)
CDH15 (NM_004933)	Exon 12 Chr16:89259988	Geterozigot	Aqliy rivojlanish buzilishi	AD	Patogenligi noma'lum (VUS) (PM2, PP3)
CLDN11 (NM_005602)	Exon 2 Chr3:170140971	Geterozigot	Gipomiyelinlovchi leykodistrofiya	AD	Patogenligi noma'lum (VUS) (PM2, PP3)
AGL (NM_000642)	Exon 30 Chr1:100379113	Geterozigot	Glikogen to'planish kasalligi	AR	Patogen (PVS1, PM2, PM3, PP5)
ALOX12B (NM_001139)	Exon 12 Chr17:7978925	Geterozigot	Tug'ma ixtioz	AR	Patogen (PM2, PM1, PM3, PP2, PP5)
SBDS (NM_016038)	Intron 2 Chr7:66459197	Geterozigot	Shvaxman-Daymond sindromi	AR	Patogen (PVS1, PM2, PP5)
SLC4A11 (NM_001174089)	Exon 5 Chr20:3214819	Geterozigot	Korneal endotelial distrofiya	AR	Patogen (PVS1, PM2, PM3, PP5)
MATN3 (NM_002381)	Intron 6 Chr2:20196883	Geterozigot	Ko'plamchi epifizial displaziya, 5	AD	Patogenligi noma'lum (VUS) (PM2)

XULOSA

QA bemorlar va ularning yaqin qarindoshlari orasida o'tkazilgan WES tekshiruv natijalari tahlilidan xulosa qilish mumkinki, butun ekzomni sekvensiyalash (WES) – irsiy omillar bilan bog'liq murakkab kasalliklarni aniqlashda asosiy vosita bo'lishi kerak. Chunki bunday kasalliklarda muammo faqat bitta emas, bir nechta turli genlardagi mutatsiyalar orqali yuzaga kelishi mumkin. Agar har bir gen alohida-alohida tekshirilsa (PTSR va Sanger usuli bilan), tashxis qo'yish juda ko'p vaqt va mablag' talab qiladi. Shu vaqt ichida esa bemor kerakli davni olmasligi mumkin. Bu holat ayniqsa QA ning sindromal turlarida xavfidir, chunki bu kabi kasalliklarda tez va aniq tashxis juda muhim.

Bugungi kunda klinik tashxis sohasida WES usuli butun genomni sekvensiyalash (WGS) usulidan ko'p jihatdan afzal hisoblanadi.

Birinchidan, WES usuli faqat oqsil kodlovchi genlar – ya'ni genomning eng yaxshi o'rganilgan qismini o'rganishga imkon beradi.

Ikkinchidan, ko'plab kasalliklar oqsillarning noto'g'ri ishlashi yoki noto'g'ri tuzilishi sababli yuzaga keladi. Bu muammolar odatda gendagi nonsens, missens mutatsiyalar yoki splaysingdagi xato natijasida yuzaga keladi. WES ana shu muammoli joylarni aniqlashga yordam beradi.

Uchinchidan, WES ancha arzonroq. Agar butun genomni sekvensiyalashda 3 milliard nukleotidni o'qish kerak bo'lsa, ekzomni sekvensiyalashda faqat 1–3% –

ya'ni kodlovchi qismlargina o'qiladi. Bu vaqt va mablag'ni tejaydi.

ADABIYOTLAR

1. Ильинский В.В., Корнеева В.А., Шаталов П.А. Применение экзомного секвенирования для диагностики наследственных неврологических и психических заболеваний // Журнал Неврологии и Психиатрии, №1, 2015, стр-45-52. doi: 10.17116/jnevro2015115114552.
2. Perkel J.M. Exome Sequencing: Toward an Interpretable Genome. Science 2013; 80: 262-265.
3. Shubina, J., Pavlova, N. S., Donnikov, A. E., Pomerantseva, E. A., Trofimov, D. Y. (2022). Perspectives and limitations of whole exome based neonatal screening. Neonatology, 10(4), 40-46. <https://doi.org/10.33029/2308-2402-2022-10-4-40-46>
4. Sy, M. R., Chauhan, J., Prescott, K., Imam, A., Kraus, A., Beleza, A., Salkeld, L., Hosdurga, S., Parker, M., Vasudevan, P., Islam, L., Goel, H., Bain, N., Park, S. M., Mohammed, S., Dieterich, K., Coutton, C., Satre, V., Vieville, G., ... Scott, D. A. (2022). Exome sequencing efficacy and phenotypic expansions involving esophageal atresia/tracheoesophageal fistula plus. American Journal of Medical Genetics, Part A, 188(12), 3492–3504. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.62976>
5. Wetterstrand K.A. DNA Sequencing Costs: Data from the NHGRI Genome Sequencing Program (GSP) 2014. <https://www.genome.gov/sequencingcosts/>