

# Микродупликация 12q24.12 у пациента с фармакорезистентной эпилепсией и задержкой развития

Беляева Е.О.<sup>1\*</sup>, Назаренко Л.П.<sup>1,2</sup>, Кашеварова А.А.<sup>1,3</sup>, Скрыбин Н.Н.<sup>1,3</sup>, Лебедев И.Н.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> — НИИ медицинской генетики, Томский НИМЦ, Томск; \* eo-belyaeva@mail.ru

<sup>2</sup> — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск

<sup>3</sup> — Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск

**Введение.** Показано, что патогенные CNV связаны с интеллектуальными нарушениями, психоневрологическими и нервно-мышечными заболеваниями. Тем не менее, до настоящего времени клиническое значение CNV не всегда определяется однозначно. Мы сообщаем о пациенте, 2-летнем мальчике, с фармакорезистентной эпилепсией, у которого была обнаружена микродупликация 12q24.12, унаследованная от здоровой матери. У пациента отмечается ряд фенотипических особенностей, грубая задержка психомоторного развития, генерализованные тонико-клонические судороги, не купирующиеся противосудорожной терапией. **Материалы и методы.** Микродупликация 12q24.12 размером 125 т.п.н. была диагностирована методом матричной сравнительной геномной гибридизации (8 x 60K, Agilent Technologies). С использованием ПЦР в режиме реального времени было подтверждено ее наличие у пробанда и определено родительское происхождение. **Результаты.** За транутная микродупликацией область содержит три гена: *ACAD10*, который экспрессируется в головном мозге плода, *MAPKAPK5*, участвующий в неврологических процессах, и *ALDH2*, который вовлечен в процессы нейродегенерации. Клинические признаки и гены, содержащиеся в области микродупликации, имеют значение для дальнейшего разграничения фенотипа микродупликации 12q24.12.

**Ключевые слова:** микродупликация 12q24.12, фармакорезистентная эпилепсия, задержка развития, матричная сравнительная геномная гибридизация

## Microduplication at 12q24.12 in a child with drug-resistant epilepsy and developmental delay

Belyaeva E.O.<sup>1\*</sup>, Nazarenko L.P.<sup>1,2</sup>, Kashevarova A.A.<sup>1,3</sup>, Skryabin N.A.<sup>1,3</sup>, Lebedev I.N.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> — Research Institute of Medical Genetics, Tomsk NRMС, Tomsk, Russia; \* eo-belyaeva@mail.ru

<sup>2</sup> — Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

<sup>3</sup> — National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

**Introduction:** It was shown that the pathogenic CNV are often associated with intellectual disability, neurological and neuromuscular diseases. However, the clinical significance of novel CNV is not always unambiguous. We report on 2-year-old male patient with drug-resistant epilepsy, in whom a 125 kb microduplication at 12q24.12 of maternal origin was detected by aCGH. Patient has marked physical and mental developmental delay, neuromotor retardation, and dysmorphic features. **Materials and Methods:** A 125 kb microduplication at 12q24.12 was detected by aCGH (8 x 60K, Agilent Technologies). Microduplication origin was analyzed by Real-Time PCR. **Results:** Affected region contains three genes: *ACAD10*, which is expressed in fetal brain, *MAPKAPK5*, which is involved in neurological processes, and *ALDH2*, which is engaged in neurodegeneration. Clinical features and the genes content are important to further delineation of the 12q24.12 microduplication phenotype.

**Key words:** 12q24.12 microduplication, drug-resistant epilepsy, developmental delay, aCGH

### Введение

Нервно-психические заболевания представляют серьезную проблему для ряда медицинских и сопряженных с ними научных дисциплин. Тот факт, что 1—3% детей имеют задержку умственного и физического развития в сочетании с дисморфиями и врожденными аномалиями [1], а доля детей-инвалидов вследствие психических расстройств в России достигает 23% [2], опреде-

ляет особую значимость исследования молекулярных основ их происхождения. К более глубокому пониманию генетических механизмов развития этих заболеваний привели последние достижения в области технологического анализа генома. На сегодняшний день матричная сравнительная геномная гибридизация (aCGH), наряду с секвенированием нового поколения (NGS), являются ведущими методами молекулярно-генетического обследова-

дования пациентов с недифференцированными формами нарушений интеллекта и нервно-психическими расстройствами. Показано, что данные заболевания ассоциированы с патогенетически значимыми CNVs, доля которых в группе пациентов подобного спектра составляет 10—15% [3]. Тем не менее, до настоящего времени клиническое значение CNV не всегда определяется однозначно, для большинства выявляемых CNV функциональная связь с патологическим фенотипом не уточнена. Идентификация новых патогенных CNV и интерпретация их клинической значимости являются ключевой проблемой, которую предстоит решить для обеспечения качественного медико-генетического консультирования семей и эффективной помощи больным детям.

### Клинический случай

Мы сообщаем о пациенте, страдающем фармакорезистентной эпилепсией и грубой задержкой развития, у которого была обнаружена микродупликация 12q24.12, унаследованная от здоровой матери.

*Пациент К., 6 мес.*, впервые проконсультирован. Мать ребенка предъявляет жалобы на задержку физического и психического развития (головку не держит, не переворачивается, не сидит), выраженную мышечную слабость, гипервозбудимость, периодически возникающие приступы судорог, плач ребенка при прикосновении, постоянное слюнотечение, скопление мокроты с невозможностью ее самостоятельного отхождения, отказ от пищи, плохой сон.

Генеалогический анамнез без особенностей, в нескольких поколениях у ближайших родственников нет ни одного случая наблюдения судорожного синдрома. Родословная родителей ребенка отягощена: первая беременность закончилась замершим плодом на сроке 9—10 недель; вторая беременность — рождением мальчика, в настоящее время мальчику 9 лет, здоров, посещает школу, учится хорошо, из заболеваний: имеет аллергию на сладкое; третья беременность закончилась рождением девочки, умершей в 1 год 2 мес., у которой в 3 мес. диагностирована врожденная катаракта, гипотония, утрата сосательного рефлекса, развернутый судорожный синдром, не отвечающий на противосудорожную терапию.

Беременность четвертая (настоящая) протекала на фоне субклинического гипотиреоза, ожирения 2 степени. Роды в 40 нед. путем операции кесарево сечение. Закричал сразу, вес при рождении 3120 г, рост 52 см. Оценка по шкале Апгар 7/8 баллов. В первые сутки отмечена вялость ребенка. При выписке поставлен диагноз: *перинатальная энцефалопатия*. До 3-х мес. развивался без особенностей. На грудном вскармливании, хорошо прибавлял в весе.

Первые признаки заболевания появились в возрасте 3 месяцев, когда мать стала замечать у ребенка задержку развития, двигательную возбудимость, гиперчувстви-

тельность при прикосновении, дрожание глаз, скопление слизи, отказ от пищи. В это же время возникли первые тонико-клонические судороги, апноэ, усилилось слюнотечение. Назначена противосудорожная терапия, подключен кортексин, массаж. Дополнительно проведенное исследование выявило врожденную катаракту обоих глаз, атрофию дисков зрительных нервов. По поводу катаракты прооперирован в 4 месяца. Ребенок неоднократно обследован и регулярно наблюдается специалистами: неврологом, эпилептологом с диагнозом: *эпилепсия, фармакорезистентная, с грубой задержкой психомоторного развития*; офтальмологом (*врожденная оперированная катаракта обоих глаз, двухсторонняя артифакция*), гастроэнтерологом (*гастроинтестинальная аллергия*), педиатром (*врожденный стридор*).

*Данные объективного исследования.* Возраст — 2 года, вес — 4900 г, рост — 71 см. При осмотре общее состояние ребенка тяжелое, самоочувствие страдает за счет генерализованных тонико-клонических судорог, которые наблюдаются ежедневно, несмотря на противосудорожную терапию. Ребенок лежит на спине, самостоятельно не переворачивается, голову не удерживает, спонтанная двигательная активность минимальна. Мышечная гипотония, гипотрофия II степени. Зрительного и слухового сосредоточения нет. В состоянии бодрствования дыхание шумное, стридорозное. Из фенотипических особенностей: долихоцефалия, нарушение роста волос, высокий лоб, гипертелоризм, монголоидный разрез глаз, эпикант, густые длинные ресницы, широкая плоская переносица, низко посаженные уши, микроретрогения, врожденное пигментное пятно на крестце.

Клинические анализы крови и мочи, биохимические анализы крови были в пределах нормальных показателей. На МРТ головного мозга визуализирована картина нарушения наружной ликвородинамики. На ЭЭГ зарегистрирована эпилептиформная активность в виде единичных острых волн справа в височно-затылочной области. На НСГ признаки лейкомаляции. На ЭхоКГ патологии не обнаружено. УЗИ внутренних органов: в печени, поджелудочной железе, селезенке, почках и щитовидной железе патологических изменений не отмечено.

Проведенные дополнительные исследования на наличие наследственных нарушений обмена (аминоацидопатии, органические ацидурии и дефекты митохондриального бета-окисления, лизосомные заболевания: Краббе, Помпе, Фабри, Гоше, Нимана—Пика, мукополисахаридоз I типа) патологии не выявили.

### Материалы и методы

Из лимфоцитов периферической крови пациента, его родителей и брата выделяли ДНК экстракцией смесью фенола и хлороформа. Поиск микрохромосомных aberrаций осуществлялся с использованием микрочипа SurePrint G3 Human CGH 8x60K (Agilent Technologies, США). Матричная сравнительная геномная гибридизация проводилась

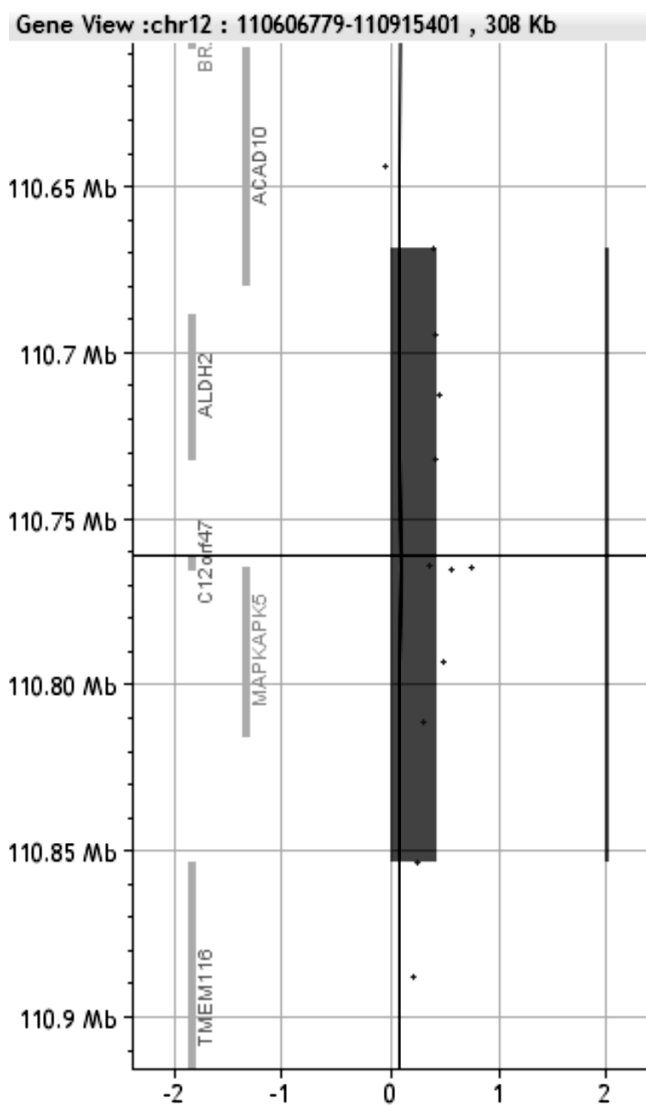


Рис. 1. Гибридационный профиль aCGH в субсегменте 12q24.12.

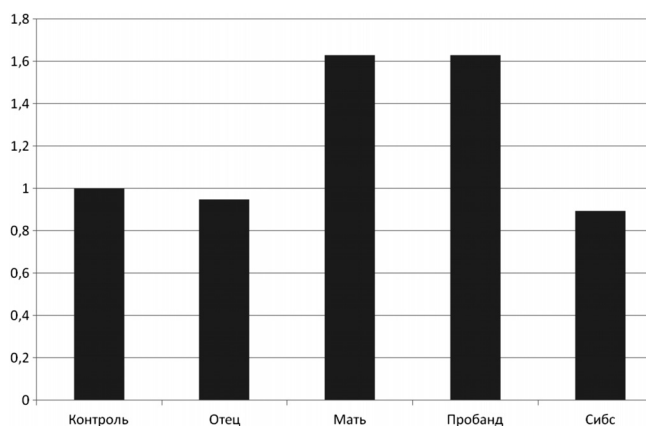


Рис. 2. Анализ родительского происхождения микродупликации 12q24.12 с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени.

согласно рекомендациям производителя микрочипов ([http://www.chem-agilent.com/pdf/G4410-90020v3\\_1\\_CGH\\_ULS\\_Protocol.pdf](http://www.chem-agilent.com/pdf/G4410-90020v3_1_CGH_ULS_Protocol.pdf)). Результаты были визуализированы в программе Cytogenomics (v3.0.2.11) (Agilent Technologies, США). Интерпретация CNVs была проведена с использованием базы данных геномных вариантов (<http://projects.tcag.ca/variation/?source=hg18>). Для потенциально патогенетически значимой CNV с использованием базы данных «Gene» (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) были определены гены-кандидаты. Для последовательности гена *ACAD10* с помощью программы Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>) подобраны праймеры для проведения ПЦР в режиме реального времени с целью подтверждения наличия обнаруженной CNV у пробанда и определения ее происхождения. ПЦР в режиме реального времени проводилась на приборе AriaMX Real-Time PCR System (Agilent Technologies, США).

### Результаты и обсуждение

По результатам aCGH-исследования была выявлена частичная трисомия 12q24.12:  $\text{arr}[\text{hg18}]12\text{q}24.12(110,668,504-110,793,312) \times 3$  (рис. 1). Методом ПЦР в режиме реального времени (Real-Time PCR) были обследованы все члены семьи (родители и брат), в результате обнаруженная CNV у пробанда была подтверждена, и выяснено, что микродупликация размером 125 т.п.н. унаследована от здоровой матери (рис. 2).

Происхождение CNV является важным и при этом неоднозначным фактором при установлении их клинической значимости. CNV, возникшие *de novo*, принято считать патогенными, в то время как CNV, унаследованные от фенотипически нормальных родителей, часто принимаются за случайные находки. С другой стороны, наследуемые микроделеции и микродупликации могут являться патогенными, но с неполной пенетрантностью, либо могут быть импринтированы.

Определение эффекта CNV также осложняется клиническим полиморфизмом. Примером является совпадение обнаруженной микродупликации с ранее описанной нами микродупликацией 12q24.12-q24.13, немного большей протяженности 142 т.п.н., но также материнского происхождения и затрагивающей те же самые 3 гена, у пациента с задержкой моторного и психического развития, моторными стереотипиями, гидроцефальным синдромом, системным недоразвитием речи, врожденными пороками развития головного мозга и идиопатической гипотрофией посттеменной и затылочной областей коры головного мозга [4]. Из фенотипических особенностей были отмечены небольшая асимметрия лица, птоз, расходящееся косоглазие, горизонтальный нистагм, большие, диспластичные ушные раковины, большой нос, открытый рот, клинодактилия V пальца, сколиоз. У двух пациентов отмечаются и перекрывающиеся признаки, такие как долихоцефалия, частичная атрофия зрительного нерва. Таким образом, два пациен-

та с идентичной микродупликацией имеют как общие, так и различающиеся клинические признаки.

В Базе данных хромосомного дисбаланса и фенотипов у человека (DECIPHER) [5] имеется информация о 10 пациентах с микродупликациями 12q24.12 (№ 253257, 254079, 254080, 254081, 254082, 255000, 261485, 262606, 287392, 300426), также затрагивающими только 3 отмеченных нами гена. Еще два пациента (№ 275287, 274139) имеют микротрипликацию данного хромосомного субсегмента. У некоторых пациентов отмечены задержка развития и нарушения психики. В семи случаях (70%) микродупликации были наследованы от фенотипически здоровых родителей. Обе микротрипликации также наследованы от родителей, которые однако не были клинически обследованы. Еще в трех случаях происхождение перестройки было не установлено. Описаний микроделеции в этой области с вовлечением трех генов в литературе и базах данных не обнаружено.

Одним из объяснений вариабельной экспрессивности и клинического полиморфизма CNV является их протяженность и вовлеченность разного количества генов. Однако в данном случае, затронутые области у обоих обследованных нами пациентов содержат только три гена: *ACAD10*, который экспрессируется в головном мозге плода, *MAPKAPK5*, участвующий в неврологических процессах, и *ALDH2*, который вовлечен в процессы нейродегенерации, что указывает на другие возможные механизмы формирования клинического полиморфизма. Точки разрыва проходят по гену *ACAD10*, который

задействован в метаболизме жирных кислот, уникальных для развития мозга [6], возможно, именно ему принадлежит ведущая роль в формировании патологического фенотипа. Клинические признаки и гены, содержащиеся в области микродупликации, имеют значение для дальнейшего разграничения фенотипа микродупликации 12q24.12.

*Авторы подтвердили отсутствие конфликта интересов.*

*Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФ № 16-15-10229.*

### Список литературы

1. L.G. American College of Medical Genetics guideline on the cytogenetic evaluation of the individual with developmental delay or mental retardation // *Genet Med*. 2005. V. 7. № 9. P. 650-654.
2. <http://www.gks.ru> — Федеральная служба статистики.
3. Newman S., Hermetz K.E., Weckselbatt B., Rudd M.K. Next-generation sequencing of duplication CNVs reveals that most are tandem and some create fusion genes at breakpoints // *Am J Hum Genet*. 2015. V. 96. № 2. P. 208-220.
4. Kashevarova A., Nazarenko L., Skryabin N. et al. Array CGH analysis of a cohort of Russian patients with intellectual disability // *Gene*. 2014. V. 536. № 1. P. 145-150.
5. <https://decipher.sanger.ac.uk/index> — База данных хромосомного дисбаланса и фенотипов у человека.
6. Svennerholm L, Stallberg-Stenhagen S. Changes in the fatty acid composition of cerebrosides and sulfatides of human nervous tissue with age // *J Lipid Res*. 1968. V. 9. № 2. P. 215-225.