

Случай туберозного склероза в Карачаево-Черкессии*

Марахонов А.В.^{1,2}, Макаов А.Х.³, Васильева Т.А.¹,
Дадали Е.Л.¹, Тимковская Е.Е.¹, Зинченко Р.А.^{1,4}

¹ — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр», Москва, e-mail: marakhonov@gyeneresearch.ru

² — Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (государственный университет)»

³ — Муниципальное бюджетное лечебно-профилактическое учреждение «Хабезская центральная районная больница», Хабез Карачаево-Черкесской Республики, e-mail: makaov@yandex.ru

⁴ — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, e-mail: renazinchenko@mail.ru

Актуальность. Изучение распространенности и молекулярной эпидемиологии туберозного склероза в разных популяциях человека является актуальным. Генетическое подтверждение клинического диагноза в раннем детстве позволяет отслеживать появление судорожных припадков и проводить их ранее лечение, что может положительно сказаться на психомоторном развитии. **Цель.** Провести подтверждающую ДНК-диагностику семейного случая туберозного склероза, выявленного в ходе экспедиции в Карачаево-Черкесскую Республику (Хабезский район). **Материалы и методы.** Таргетное высокопроизводительное секвенирование клинически важных генов, секвенирование по Сэнгеру. **Результаты.** У пробанда с использованием высокопроизводительного секвенирования выявлена частая нонсенс-мутация (NM_000368.4(*TSC1*):c.2074C>T), приводящая к возникновению преждевременного стоп-кодона в 692 положении *TSC1*. Мутация подтверждена у пораженных сибсов пробанда и его матери секвенированием по Сэнгеру. **Выводы.** Использование современных методов секвенирования позволило идентифицировать патогенную мутацию в семейном случае туберозного склероза, подтвердить клинический диагноз и провести медико-генетическое консультирование в семье.

Ключевые слова: медицинская генетика, наследственные заболевания, туберозный склероз, высокопроизводительное секвенирование

Введение

Туберозный склероз (ТС) — аутосомно-доминантное наследственное заболевание, впервые описанное Фридрихом фон Реклингхаузенем в 1862 г., но в литературе закрепилось имя Дезире-Маглуара Бурневилля, предложившего термин «туберозный склероз» (ТС) в 1880 г. и описавшего изменения в головном мозге [1]. Для ТС характерна классическая триада признаков — судороги (93%), умственная отсталость (48–62%) и ангиофибромы различных участков кожи (83%). Дебют заболевания относят к 2–5 годам жизни с судорожных припадков (большие, малые, кивки), отставания в психомоторном развитии, являющихся следствием гамартом головного мозга. Внутрочерепные кальцификаты, чаще расположенные в начале болезни перивентрикулярно или в базальных ядрах (51%), приводят к эпилепсии и различной степени умственной отсталости. Тяжесть умственной отсталости и эпилептических припадков зависят от степени поражения головного мозга гамартомами и варьирует от умеренной до глубокой. У всех детей с ТС и умственной отсталостью отмечаются эпилептические припад-

ки, тогда как эпилепсия в группе детей с сохранным интеллектом наблюдается в 2/3 случаев и только у 44 % из них припадки начинаются до 5 лет. Прогрессированию умственной отсталости способствуют частые эпилептические припадки. Поражение кожи включает ангиофибромы различной локализации и окраски и гипопигментированные пятна трех основных типов: пятна-отпечатки, пятна-листья и пятна-конфетти (размер 1–3 мм). Возможны пятна цвета кофе с молоком (в 15,4% случаев), фиброзные бляшки (25%) и околоногтевые фибромы (17–52%) [2].

У больных ТС находят мутации в одном из двух функционально связанных генах — расположенном на хромосоме 9q32-34 гене *TSC1*, который кодирует гамартин, и локализованном в области 16p13.3 гене *TSC2*, отвечающем за синтез туберина [3]. Данные белки являются супрессорами опухолевого роста, образуют гетеродимерный комплекс и ингибируют активность белка-мишени рапамицина mTOR — серин-треониновой киназы, играющей ключевую роль в контроле роста клетки и пролиферации через регуляцию биосинтеза рибосом и трансляцию белков [4].

* Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Исследование частично поддержано грантами РФФИ 14-04-00525 и 15-04-01859.

Авторы благодарны за неоценимую помощь и инициативу в организации исследования сотрудникам Министерства здравоохранения Республики Карачаево-Черкессии и сотрудникам Хабезской ЦРБ.

Около 2/3 случаев ТС представляют собой пациенты без семейной истории. ТС зачастую диагностируется врачом-дерматологом по характерной картине лицевых ангиофибром, однако все пациенты должны быть также консультированы врачом-генетиком для подтверждения диагноза и раннего выявления субэпендимальных гигантоклеточных астроцитом (subependymal giant cell astrocytomas, SEGA) и ангиомиолипом почек — частых осложнений ТС, которые представляют собой одну из основных причин инвалидизации и смертности больных. Данные доброкачественные осложнения поддаются хирургическому лечению при раннем выявлении. Генетическое подтверждение диагноза в раннем детстве позволяет отслеживать появление судорожных припадков и проводить их ранее лечение, что может положительно сказаться на психомоторном развитии [5]. Более того, современные знания о молекулярном патогенезе ТС позволяют применить ингибиторы мишени рапамицина (mTOR) для предотвращения и лечения доброкачественных новообразований, что существенно улучшило исход у пациентов [6]. Ингибиторы mTOR также применяются для лечения лицевых ангиофибром.

В настоящей работе мы описываем семейный случай ТС, выявленный в черкесской семье в Карачаево-Черкессии.

Материалы и методы

Исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ «МГНЦ». Пробанд и члены семьи были выявлены и обследованы в ходе полевой экспедиции сотрудников ФГБНУ «МГНЦ» в Карачаево-Черкесскую Республику (Хабезский район) в 2015 г. Численность района составляет 25 474 чел., из которых более 90% — черкесы.

ДНК из образцов периферической крови пробанда и членов семьи выделялась с использованием набора Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA) в соответствии с рекомендациями производителя.

ДНК-диагностика выполнена методом высокопроизводительного секвенирования. Анализ ДНК пациента проведен на секвенаторе нового поколения Illumina NextSeq 500 методом парно-концевого чтения (2 x 151 п.н.) со средним покрытием не менее 100x. Для пробоподготовки была использована методика селективного захвата участков ДНК, относящихся к кодирующим областям генов с известным клиническим значением. Обработка данных секвенирования проведена с использованием автоматизированного алгоритма, включающего выравнивание прочтений на референсную последовательность генома человека (hg19), постпроцессинг выравнивания, выявление вариантов и фильтрацию вариантов по качеству, а также аннотацию выявленных вариантов по всем известным транскриптам каждого гена из базы RefSeq с применением ряда методов предсказания патогенности замен (SIFT, PolyPhen2-HDIV, PolyPhen2-HVAR, MutationTaster, LRT), а также методов расчета эволюционной консер-

вативности позиций (PhyloP, PhastCons). Для оценки популяционных частот выявленных вариантов использованы выборки проектов «1000 геномов», ESP6500 и Exome Aggregation Consortium. Для оценки клинической релевантности выявленных вариантов использованы база данных OMIM, специализированные базы данных по отдельным заболеваниям и данные литературы.

Секвенирование по Сэнгеру проводилось с использованием набора BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit на анализаторе 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

Результаты и обсуждение

В ходе медико-генетического обследования населения Хабезского района Карачаево-Черкесской Республики, выявлена семья с характерной клинической картиной ТС. У пробанда, девочки 10 лет, черкески по национальности, с шести месяцев начались судороги с последующей задержкой психомоторного развития. Родилась с нормальным весом (3200 г) в срок от второй беременности. Со слов фельдшера начала сидеть с шести-семи месяцев, ходить — с одного года и двух месяцев. На коже спины и груди имеются депигментированные пятна неправильной формы (пятна-отпечатки и пятна-листья). Отмечается спастический тетрапарез, при самостоятельной ходьбе — атаксия. Не разговаривает. Интеллектуальное развитие соответствует имбецильности. Пробанд имеет трех единоутробных сибсов: двух сестер (семи и двух лет) и одного брата (11 лет). Все сибсы имеют той или иной степени выраженности схожую клиническую картину: умственную отсталость/ задержку психомоторного развития, лицевые ангиофибромы, депигментированные пятна на коже туловища, большие и малые судороги. Мать пробанда, 35 лет, отмечает судороги с 18 лет, имеет выраженные лицевые ангиофибромы, легкую степень умственной отсталости и практически не разговаривает. Имеет одну здоровую и одну больную сестру. МРТ головного мозга больным не проводилось, что делает затруднительным оценить степень поражения головного мозга. По данным медицинской документации, отец пробанда, был здоров. Наличие заболевания у деда или бабушки пробанда со стороны матери оценить не представляется возможным, так как они умерли. С учетом характера наследования и специфической клинической картины в семье был поставлен диагноз *туберозный склероз*.

Для молекулярного подтверждения диагноза у пробанда проведено высокопроизводительное секвенирование генов, имеющих описанное клиническое значение. В результате секвенирования была обнаружена мутация NM_000368.4(*TSC1*):c.2074C>T в гетерозиготном состоянии, локализованная в 17-м экзоне мПНК гена *TSC1* и приводящая к возникновению преждевременного стоп-кодона в 692 положении (p.Arg692*). Мутация не

зарегистрирована в контрольных выборках «1000 геномов», «6500 экзомов» и ExAC.

Впервые данная мутация была описана в 1997 г. у пациента с семейной историей в работе, в которой ген *TSC1* был идентифицирован на хромосоме 9q34 [7]. Согласно базе данных университета Лейдена, мутация является зарегистрированной 57 раз у пациентов с ТС, как при спорадических случаях, так и в семейных (OMIM #191100) [8].

Молекулярная диагностика, проведенная у пораженных матери и сибсов пробанда, показала, что мутация cosegregирует с заболеванием в данной семье.

Выводы

Распространенность ТС в Хабезском районе составила 1:3496, в других 9 популяциях и этнических группах КЧР заболевание не выявлено, что может быть связано как с истинными различиями в распространенности, так и с трудностями диагностики ТС врачами. Таким образом, распространенность заболевания в КЧР составила 1:45422 (для сравнения в Татарстане 1:26158, в Башкирии 1:21721, в Удмуртии 1:77678, в Ростовской области 1:100000) [9]. Использование современных технологий высокопроизводительного секвенирования значительно облегчает поиск мутаций у больных таким заболеванием, как ТС. Заболевание может быть вызвано мутациями в генах *TSC1* и *TSC2*. С учетом размеров генов *TSC1* и *TSC2* и отсутствия частых мутаций в них, целесообразным представляется применение именно технологий высокопроизводительного секвенирования на первом этапе поиска патогенной мутации в семье. Несмотря на то, что определенные фено-генотипические корреляции между проявлениями ТС и мутациями в том или ином гене описаны [10], они не позволяют провести дифференциальную диагностику. Сложность диагностики часто приводит к тому, что пациенты с ТС не полу-

чают квалифицированную медико-генетическую помощь и прогноз потомства. Прежде чем прогнозировать вероятность повторного рождения больных детей, необходимо выяснить, нет ли у ближайших родственников больного гипопигментированных пятен, седых прядей волос, дефектов зубной эмали или околоногтевых фибром, а также перивентрикулярных гамартом по данным МРТ головного мозга) и ангиомиолипом почек (по данным УЗИ) [2, 11].

Список литературы

1. Bourneville, D.M., Sclerose tubereuse des circonvolutions cerebrales: idiotie et epilepsie hemiplegique. Arch Neurol, 1880. 1: p. 81-91.
2. Кенетт, Л.Д., Наследственные синдромы по Дэвису Смит. Атлас-справочник. Пер. с англ. 2011, М.: Практика.
3. Morrison, P.J., et al., Advances in the genetics of familial renal cancer. Oncologist, 2010. 15(6): p. 532-8.
4. Crino, P.B., K.L. Nathanson, and E.P. Henske, The tuberous sclerosis complex. N Engl J Med, 2006. 355(13): p. 1345-56.
5. Morrison, P.J. and D.E. Donnelly, How common is tuberous sclerosis complex? Br J Dermatol, 2016. 174(6): p. 1184-5.
6. Krueger, D.A., et al., Everolimus for subependymal giant-cell astrocytomas in tuberous sclerosis. N Engl J Med, 2010. 363(19): p. 1801-11.
7. van Slegtenhorst, M., et al., Identification of the tuberous sclerosis gene *TSC1* on chromosome 9q34. Science, 1997. 277(5327): p. 805-8.
8. Leiden Open Variation Database for tuberous sclerosis 1 (*TSC1*). [доступ от 29.07.2016]; Available from: <http://www.LOVD.nl/TSC1>.
9. Зинченко, Р.А., et al., Дифференциация этнических групп России по генам наследственных болезней. Медицинская генетика, 2007. 6(2): p. 29-37.
10. Jansen, F.E., et al., Overlapping neurologic and cognitive phenotypes in patients with *TSC1* or *TSC2* mutations. Neurology, 2008. 70(12): p. 908-15.
11. Зинченко, Р.А. и Е.К. Гинтер, Особенности медико-генетического консультирования в различных популяциях и этнических группах. Медицинская генетика, 2008. 7(10): p. 20-29.

Tuberous sclerosis case in Karachay-Cherkess Republic

Marakhonov A.V.^{1,2}, Makaov A.Kh.-M.³, Vasilyeva T.A.¹, Dadali E.L.¹, Timkovskaya E.E.¹, Zinchenko R.A.^{1,4}

¹ — Federal state scientific budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics», Moscow, 115478, e-mail: marakhonov@gensearch.ru

² — Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Moscow, 141701

³ — Municipal Budgetary Health Care setting «Habezskaya central district hospital», Habez, Karachai-Cherkess Republic, 369400, e-mail: makaov@yandex.ru

⁴ — Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997, e-mail: renazinchenko@mail.ru

Importance. To perform molecular diagnosis in familial case of tuberous sclerosis in Karachay-Cherkess Republic. **Objective.** To confirm clinical diagnosis of tuberous sclerosis in proband and his relatives. **Design, Setting and Participants.** High-throughput sequencing (HTS) was used for initial molecular diagnosis in proband. Sanger sequencing was used to confirm high-throughput sequencing data and to determine mutation status in the family. **Results.** Recurrent nonsense mutation was identified in proband and his affected relatives. Mutation lead to premature stop codon in 692 codon of *TSC1*. Mutation was confirmed in affected relatives of proband. **Conclusions and Relevance.** Combination of HTS with detailed analysis of clinical data enabled to identify causative mutation in a family with tuberous sclerosis. Mutation co-segregated with the disease in the family.

Key words: medical genetics, hereditary diseases, tuberous sclerosis, high-throughput sequencing