

Случай сочетания двух редких неврологических болезней, выявленных панельным экзомным секвенированием

Руденская Г.Е.¹, Шумарина А.О.², Антонен А.В.²,
Сермягина И.Г.¹, Крылова Т.Д.¹, Щагина О.А.¹

¹ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр» (МГНЦ), 115478, Москва, ул. Москворечье д.1, e-mail: rudenskaya@med-gen.ru

² ООО «Геномед»

У больной 12 лет с очень ранней эпилепсией (ремиссия), отставанием в психомоторном развитии, гиперкинетическим синдромом и умеренным лактат-ацидозом методами панельного экзомного секвенирования и подтверждающего секвенирования по Сэнгеру выявлены две независимые редкие болезни с частично перекрывающимися фенотипами: аутосомно-доминантная младенческая эпилептическая энцефалопатия 42-го типа (ранее описанная мутация p.Ala713Thr *de novo* в гене *CACNA1A*) и аутосомно-рецессивная недостаточность комплекса I дыхательной цепи митохондрий (компаунд-гетерозиготность по ранее описанным мутациям p.Trp22Arg и p.Cly70* в гене *NDUFB3*). Обсуждается клиническое разнообразие выявленной *NDUFB3*-связанной болезни.

Ключевые слова: панельное экзомное секвенирование, младенческая эпилептическая энцефалопатия 42-го типа, недостаточность комплекса I дыхательной цепи митохондрий, ген *CACNA1A*, ген *NDUFB3*.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Coincidence of two rare neurologic diseases detected by panel next-generation sequencing

Rudenskaya G.E.¹, Shumarina A.O.², Antonets A.V.²,
Sermyagina I.G.¹, Krylova T.D.¹, Shchagina O.A.¹

¹ FSBI Research Centre for Medical Genetics, Moskvorechie 1, 115478 Moscow, e-mail: rudenskaya@med-gen.ru

² Genomed Ltd, Moscow

In a 12-year-old female with early-onset epilepsy (remission), development delay, hyperkinesias and moderate lactic acidosis two independent rare disorders with overlapping phenotypes were detected by panel exome sequencing and confirmed by Sanger sequencing: autosomal dominant infantile epileptic encephalopathy type 42 (previously reported *CACNA1A* mutation p.Ala713Thr *de novo*) and autosomal recessive mitochondrial respiratory chain complex I deficiency (compound heterozygosity for previously reported *NDUFB3* mutations p.Trp22Arg and p.Cly70* in *NDUFB3* gene). Clinical heterogeneity of *NDUFB3*-related disease is discussed.

Key words: infantile epileptic encephalopathy type 42, mitochondrial respiratory chain complex I deficiency, *CACNA1A* gene, *NDUFB3* gene, panel exome sequencing.

Наблюдение

Секвенирование нового поколения NGS (Next-Generation Sequencing) в разных вариантах — панельное, полноэкзомное, полногеномное — за короткое время прочно вошло в практику медико-генетического консультирования. Многие случаи представляют трудности трактовки результатов, в частности, при нескольких потенциально значимых молекулярно-генетических находках. Обычно после детального сопоставления с фенотипом и проверки данных NGS секвенированием по Сэнгеру с привлечением родителей и/или других родственников удается установить один диагноз.

В представленном наблюдении выявлено сочетание двух болезней с частично перекрывающимися фенотипами. Обе редкие болезни генетически гетерогенны и имели мало шансов быть диагностированными другими методами ДНК-анализа.

Больная А. впервые консультирована в МГНЦ в 9 лет по поводу выраженной задержки психоречевого развития (ЗПРР), эпилепсии (медикаментозная ремиссия), гиперкинезов. Наследственность не отягощена, брат 15 лет здоров. Беременность без значимой патологии, роды — кесарево сечение, Масса тела при рождении 3200 г, 8/8 баллов по шкале Апгар. С первых часов жизни начались генерализованные миоклонические серийные судороги; две недели находилась в специализированном стационаре, где была осмотрена нами: явные признаки генетической патологии не найдены; состояние расценивалось как среднетяжелое. На фоне антиконвульсантов судороги быстро прекратились, но в год без явных причин возобновились: разной частоты, полиморфные, включая тяжелые генерализован-

ные, купировавшиеся только медикаментозно (особенно до 3 лет). Помимо миоклоний появился тремор рук и ног, иногда головы. Пошла в 1 год 3 мес., ходила неустойчиво из-за тремора, затруднявшего также движения рук. В 3,5 года после легкого ушиба головы и невысокого фебрилитета был эпизод резкой общей слабости с усилением тремора, глазодвигательными нарушениями. Наблюдалась в Республиканской детской клинической больнице, где предполагали параинфекционный опсоклонус-миоклонус. С 6 лет после подбора терапии припадки прекратились, снижение дозы депакина в 8 лет вызвало рецидив, но при возврате к прежней схеме судороги не возобновлялись. Тремор сохраняется, нарастает при волнении. ЗППР с раннего возраста, с частичной положительной динамикой. Сформированы навыки опрятности, тремор мешает самостоятельно есть, но держит карандаш и т.п. Понимает речь, выполняет доступные инструкции; с 7 лет появились короткие фразы, выраженная дислалия несколько уменьшилась, начала общаться с детьми, занимается в коррекционной группе. Зрение, слух в норме. Соматически здорова. МРТ без патологии; эпилептической ЭЭГ-активности нет. Ранее генетически обследована: кариотип 46, XX; в лаборатории НБО МГНЦ не выявлено изменений при тандемной масс-спектрометрии аминокислот и ацилкарнитинов, исключен нейрональный цероид-липофусциноз 1-го типа, не найдены частые мутации в гене *CLN2*, вызывающие нейрональный цероид-липофусциноз 2-го типа. В 3 года и в 9 лет выявляли умеренный лактат-ацидоз: 3,4—4,6 ммоль/л ($N < 2$). Осмотр: окружность головы 52 см, рыжие волосы («как борода отца»), два кожных пятна цвета «кофе с молоком»; глазодвигательных расстройств нет, рефлексы средней живости, генерализованный тремор, усиливающийся из-за беспокойства (трудно оценить интенционный компонент), ходит без опоры; отвечает на простые вопросы (имя брата и др.), выражена дизартрия.

По клинической картине были исключены другие нейрональные цероид-липофусцинозы (отсутствие атрофии при МРТ), миоклонус-эпилепсия Унферрихта-Лундборга, ганглиозидозы. По мнению наблюдавшего девочку эпилептолога, исключался синдром Драве (младенческая эпилептическая энцефалопатия 6-го типа — самая частая в этой группе). С учетом миоклоний в анамнезе и лактат-ацидоза мы предположили митохондриальную болезнь (МБ). В лаборатории НБО методом MLPA не найдены частые мутации мтДНК в клетках крови, методом иммуноферментного анализа выявлена повышенная концентрация фактора роста фибробластов FGF-21 в плазме: более 3000 пг/мл (норма 0—330). FGF21 — вторичный биохимический маркер МБ, его повышение характерно для патологии дыхательной цепи митохондрий с миопатией (но симптомов миопатии у ребенка нет). Секвенирование мтДНК и панельное NGS ядерных генов МБ в тот период (2014 г.)

в лаборатории НБО не проводились, диагноз не был установлен.

Семья обратилась повторно через 2,5 года с данными NGS. Девочке 12 лет, судороги не повторялись; начали снижать дозу депакина; метаболических кризов не было; умственное развитие немного улучшилось, но ЗППР выражена; сохраняется тремор. В фенотипе дополнительно отмечена умеренная низкорослость (135 см).

NGS проведено в лаборатории «Геномед» с применением технологии Illumina на приборе NextSeq 500; использована разработанная в лаборатории панель «наследственные эпилепсии». Найдены три ранее описанные гетерозиготные мутации двух генов: мутация c.2137G>A (p.Ala713Thr) в экзоне 17 гена *CACNA1A*, ответственного за аутосомно-доминантную младенческую эпилептическую энцефалопатию 42-го типа (МЭЭП-42, OMIM 617106), а также мутации c.64T>C (p.Trp22Arg) в экзоне 2 и c.208G>T (p.Cly70*) в экзоне 3 гена *NDUFB3*, вызывающего одну из аутосомно-рецессивных форм недостаточности комплекса I дыхательной цепи митохондрий (НКДЦМ-I, OMIM 252010). Мутации p.Ala713Thr в гене *CACNA1A* и p.Trp22Arg в гене *NDUFB3* расценены как патогенные, p.Cly70* в гене *NDUFB3* — как вероятно патогенная.

В лаборатории ДНК-диагностики МГНЦ находки верифицированы прямым автоматическим секвенированием по Сэнгеру. При секвенировании экзона 17 гена *CACNA1A* мутация p.Ala713Thr найдена у ребенка и не обнаружена у родителей, т.е. возникла *de novo*, что типично для МЭЭП-42. Секвенирование экзонов 2 и 3 гена *NDUFB3* выявило две мутации у больной и доказало их транс-положение: мутации p.Trp22Arg и p.Cly70* в гетерозиготном состоянии найдены у матери и отца соответственно.

Клиническая картина больной согласуется с диагнозом МЭЭП-42. Что касается НКДЦМ-I, связанной с геном *NDUFB3*, анализ литературы показал, что наше представление об этой болезни как гораздо более тяжелой, чем у А., было неполным.

Таким образом, диагностированы две болезни ЦНС: аутосомно-доминантная МЭП-42 и аутосомно-рецессивная НКДЦМ-I.

Диагноз НКДЦМ-I важен в плане наблюдения и лечения: из-за риска поражения печени при МБ не рекомендуются вальпроаты (к ним относится депакин, который получает А.); необходима настороженность в отношении возможных обострений даже при нетяжелых инфекциях, травмах и т. п. (вероятно, такой криз был у А. в 3,5 года). Что касается коэнзима Q10, L-карнитина и других «митохондриальных» препаратов, их назначение при МБ скорее традиционное, эмпирическое: доказательных свидетельств эффективности и отсутствия побочного действия высоких доз мало.

Для родителей была важной информация о низком риске для будущего потомства сына.

Обсуждение

Независимое сочетание двух моногенных болезней — довольно редкое событие, но встречалось в нашей практике и до появления NGS. Например, наследственная моторно-сенсорная нейропатия 1А типа в одном случае сочеталась с синдромом Ретта, в другом — с глухотой, вызванной мутациями гена *Cx26*, в третьем — с периодической болезнью. NGS повышает вероятность таких находок, в том числе, неожиданных. У нашей больной найдены редкие формы со значительно перекрывающимися фенотипами, обе принадлежат к чрезвычайно гетерогенным группам. В диагностике гетерогенных болезней, таких, как наследственные эпилепсии, роль NGS особенно велика [1].

Порядковый номер «42» в названии МЭЭП говорит сам за себя. Последней в перечне в настоящее время является МЭЭП-55 [2]. Кроме того, есть генокопии, формально не относящиеся к МЭЭП, но фактически являющиеся ими.

Ген альфа-1-субъединицы кальциевого канала *CACNA1A* вызывает также другие аутосомно-доминантные болезни: эпизодическую атаксию 2-го типа, семейную гемиплегическую мигрень 1-го типа с атаксией и без атаксии, спиноцеребеллярную атаксию 6-го типа. МЭЭП-42 выделена позже других фенотипов методами NGS в больших международных выборках [3, 4]. Мутация p.Ala713Thr описана в нескольких семьях: в двух спорадических случаях она возникла *de novo*, как у А., в семье с двумя больными сибсами выявлен мозаицизм у здоровой матери (клон мутантных клеток в лимфоцитах 6,3%) [3, 4]. Описан также микроделеционный вариант: у ребенка 5 лет с МЭЭП неясной природы при хромосомном микроматричном анализе найдена микроделеция, захватывающая локус *CACNA1A* [5]. Для болезни характерно врожденное/очень раннее начало и полиморфизм припадков, как у А., степень ЗППР (в дальнейшем — умышленной отсталости) колеблется от умеренной до тяжелой; типичны гиперкинезы, носящие у А. стойкий характер. Общей для МЭЭП считалась фармакорезистентность эпилепсии, но, как показывает наш случай, возможна длительная ремиссия — даже на уровне ЭЭГ.

НКДЦМ-I — самая частая МБ детского возраста, имеющая многочисленные формы с разными типами наследования: аутосомно-рецессивным, Х-сцепленным, митохондриальным. Под общим индексом OMIM 252010 указано более 20 ядерных генов, в том числе, *NDUFB3*, на долю которого приходится часть случаев. Клиническая вариабельность также очень выражена. Случаи с началом в младенчестве обычно бывают тяжелыми, с характерным для МБ многосистемным поражением, часто ранней смертью [6, 7]. Это относится и к *NDUFB3*-связанной форме. Так, у девочки из англо-голландской семьи была резкая задержка внутриутробного развития, плохо прибавляла в весе, с 1-й недели начались состояния метаболического ацидоза, умерла

в 4 мес; полноэкзомное NGS выявило гомозиготность по мутации *NDUFB3* p.Trp22Arg (имеющейся у нашей больной в гетерозиготном состоянии) [8]. В группе случаев НКДЦМ-I, выявленной методами NGS, одна больная имела тот же генотип по мутациям *NDUFB3*, что в нашем наблюдении. У этой девочки, родившейся на сроке беременности 35 нед. с массой тела 1820 г, с первых дней жизни наблюдались выраженный лактат-ацидоз, кетонемия, резкое повышение уровня жирных кислот в крови; лечение дихлорацетатом улучшило метаболический статус. Выявлены глухота, гепатомегалия, биохимические признаки НКДЦМ-I, негрубые признаки МБ в мышечном биоптате. При МРТ в 6 мес. обнаружены задержка миелинизации и атрофия лобных долей, но признаки синдрома Ли отсутствовали. Судорог, патологии сердца не было. При интеркуррентных инфекциях развивались тяжелые метаболические кризы лактат-ацидоза, купирующиеся бикарбонатом натрия. К моменту установления диагноза в 2,5 года резко отставала в росто-весовых показателях и двигательном развитии: на фоне мышечной гипотонии даже не держала голову. Лечение кетогенной диеты, коэнзимом Q и рибофлавином не улучшили ни клиническое состояние, ни лабораторные показатели [7]. Приведенные наблюдения были значительно более тяжелыми, чем наше (хотя у обеих больных не было эпилепсии). Однако та же мутация *NDUFB3* p.Trp22Arg может быть ассоциирована с очень «мягким» фенотипом. При полноэкзомном секвенировании у 10 детей из 8 не связанных между собой неинбредных семей (7 ирландских и английская) была выявлена эта мутация в гомозиготном состоянии. На момент обследования в 10 мес. — 10 лет (только двое обследованных младше года, 6 — старше 5 лет) единственными симптомами были низкорослость разной степени и негрубые черты дисморфогенеза (выпуклый лоб, глубоко посаженные глаза, низко расположенные уши, сглаженный фильтр), у 8 из 10 — лактат-ацидоз разной степени. В младенчестве большинство этих детей имели более выраженные проявления МБ с дальнейшей положительной динамикой; в одной семье новорожденная сестра двух сибсов умерла на фоне тяжелых метаболических расстройств. Выборка для NGS была составлена на основании раннего анамнеза, двое сибсов с неосложненным ранним развитием были включены только по сходству особенностей внешности с другими детьми [9]. У А. также имеются низкорослость и лактат-ацидоз. Таким образом, НКДЦМ-I, связанная с геном *NDUFB3*, даже при общности мутаций демонстрирует очень широкий фенотипический спектр — от крайне тяжелых раннелетальных форм до минимальных проявлений при благополучном выходе из младенческого возраста. Наша больная в этом спектре занимает промежуточное место. Ирландская группа представляет интерес с точки зрения дисморфогенетических признаков: если низкорослость характерна для многих МБ, то черты дисморфогенеза нетипичны (кроме форм, связанных с генами

PUS1 и *FBXL4*). Подчеркивается важность учета признаков дисморфогенеза — даже легких и даже при подозрении на болезни, для которых дисморфогенез считается нетипичным [9]. Это положение находится в русле вновь возросшего внимания к детальному описанию фенотипов — не только при синдромальной и хромосомной патологии.

Список литературы

1. Moller RS, Dahl HA, Helbig I. The contribution of next generation sequencing to epilepsy genetics. *Expert Rev Mol Diagn.* 2015; 15: 1531-1538.
2. OMIM (On-line Mendelian Inheritance in Man) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
3. Allen AS, Berkovic SF, Cossette P et al. Epi4K Consortium; Epilepsy Phenome/Genome Project. De novo mutations in epileptic encephalopathies. *Nature* 2013; 501: 217-221.
4. Epi4K Consortium. De Novo Mutations in *SLC1A2* and *CACNA1A* are important causes of epileptic encephalopathies *Am J Hum Genet.* 2016; 99: 287-298.
5. Hino-Fukuyo N, Kikuchi A, Arai-Ichinoi N et al. Genomic analysis identifies candidate pathogenic variants in 9 of 18 patients with unexplained West syndrome. *Hum Genet.* 2015; 134: 649-658.
6. Fassone E, Rahman S. Complex I deficiency: clinical features, biochemistry and molecular genetics. *J Med Genet.* 2012; 49: 578-590.
7. Haack TB, Haberberger B, Frisch EM et al. Molecular diagnosis in mitochondrial complex I deficiency using exome sequencing. *J Med Genet.* 2012; 49: 277-283.
8. Calvo SE, Compton AG, Hershman SG et al. Molecular diagnosis of infantile mitochondrial disease with targeted next-generation sequencing. *Sci Transl Med.* 2012; 4: 118ra10.
9. Alston CL, Howard C, Olahova M et al. A recurrent mitochondrial p.Trp22Arg *NDUFB3* variant causes a distinctive facial appearance, short stature and a mild biochemical and clinical phenotype. *J Med Genet.* 2016; 53(9): 634-641.