

ДНК-диагностика наследственного ангионевротического отека и клиническое значение вариантов гена *SERPING1*

Близнец Е.А.¹, Ряднинская Н.В.¹, Галеева Н.М.¹, Кузнецова И.А.¹,
Дмитриева А.В.², Латышева Т.В.², Латышева Е.А.², Гусева М.Н.^{3,4}, Поляков А.В.¹

¹ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»

² ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА

³ КДЦ Клиники ФГБОУ ВО СПбГПМУ Минздрава России

⁴ ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора

Наследственный ангионевротический отек (HAO) I и II типа включен в группу орфанных наследственных заболеваний, для которых есть эффективное патогенетическое лечение. Заболевание значительно ухудшает качество жизни больного и нередко приводит к жизнеугрожающим состояниям и смерти. Согласно зарубежным исследованиям, почти все случаи HAO I и II типа обусловлены мутациями в гене *SERPING1*. В данной работе представлены результаты поиска мутаций в гене *SERPING1* среди 331 неродственных семейных и изолированных российских случаев HAO методами секвенирования по Сэнгеру и анализа количественной MLPA всех экзонов гена. В результате выявлена 91 мутация в 112 случаях заболевания, являющаяся или вероятно являющаяся причиной HAO. Среди данных мутаций 48% ранее не описаны в литературе. Также обнаружены 10 доброкачественных или вероятно доброкачественных вариантов гена. В спектре мутаций в гене *SERPING1* преобладают миссенс-мутации, также часто встречаются делеции, мутации в сайтах сплайсинга и нонсенс-мутации, реже — инсерции, протяженные делеции и indels. При анализе выборки пациентов зафиксировано неравное соотношение полов с двукратным преобладанием пациенток женского пола, для выяснения причины которого требуется дополнительное исследование.

Ключевые слова: наследственный ангионевротический отек, ген *SERPING1*.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

DNA diagnostics of hereditary angioedema and the clinical significance of the *SERPING1* gene variants

Bliznetz E.A.¹, Ryadninskaya N.V.¹, Galeeva N.M.¹, Kuznetsova I.A.¹,
Dmitrieva A.V.², Latysheva T.V.², Latysheva E.A.², Guseva M.N.³, Polyakov A.V.¹

¹ Research Centre for Medical Genetics

² Institute of Immunology

³ Consultative and Diagnostic Center of Saint-Petersburg State Pediatric Medical University

The hereditary angioedema type I/II is included in group of orphan hereditary diseases for which there is an effective pathogenic treatment. The disease considerably diminishes the quality of the patient life and quite often leads to life threatening complaints and death. According to foreign researches, almost all cases of the disease are caused by mutations in the *SERPING1* gene. In this work search results of mutations in *SERPING1* gene among 331 unrelated family and isolated Russian cases with hereditary angioedema by using the Sanger sequencing and the quantitative MLPA for all gene exons are presented. Total of 91 mutations, which cause or possibly cause angioedema, in 112 cases were revealed. Among these mutations 48% were not published in literature earlier. Ten benign or likely benign variants of the gene are also found. In the spectrum of the *SERPING1* mutations, missens-mutations prevail, deletions, splice site mutations and nonsense-mutations are often observed, insertions, large deletions and indels is rarer. The analysis of the patient sample discovered a twofold predominance of female among the patients of the reason requires an additional research.

Keywords: hereditary angioedema, *SERPING1* gene.

Введение

Рецидивирующие ангиотеки наблюдаются при различных приобретенных и наследственных заболеваниях [1, 2]. Наиболее часто отеки сопровождают крапивницу; среди случаев рецидивирующих ангиотек без крапивницы 25% составляют наследственные формы, 16% вызваны внешними аллергенами или физическими стимулами, 11% связаны с терапией ингибиторами АПФ, 7% отяго-

щают аутоиммунные или инфекционные заболевания и для остальных пациентов причина отеков остается неустановленной [3]. В зависимости от размера и локализации ангиотек может вызывать боль, приводить к ограничению подвижности, искажению внешности и нередко к жизнеугрожающему состоянию [4]. Опасной особенностью обострения является непредсказуемое и стремительное развитие отека, что приводит к смерти каждого третьего больного без своевременного оказания медицин-

ской помощи, если отек развивается в области дыхательных путей [5]. В США, Канаде и Великобритании, треть пациентов с ангиотеками обращаются в отделения неотложной медицинской помощи, что составляет 0,1–0,37% всех обращений, из них в госпитализации и оказании помощи в условиях стационара нуждаются 11% пациентов [6]. В итоге ангиотеки являются второй по частоте причиной госпитализации больных с аллергическими заболеваниями после бронхиальной астмы [7].

Патофизиология ангиотек объясняется несколькими механизмами, связанными либо с обменом гистамина (аллергические отеки, обычно сочетающиеся с крапивницей), либо с повышенным содержанием брадикинина в плазме крови (неаллергические рецидивирующие отеки без крапивницы), либо с сочетанным влиянием указанных вазоактивных медиаторов [8, 9]. Тактика лечения и профилактики рецидивов аллергических и неаллергических отеков имеет принципиальные различия, поэтому для выбора эффективной терапии необходима точная диагностика патогенетической формы заболевания [1, 2, 6, 9]. В основе патогенеза всех известных наследственных форм ангиотека (HAO) лежит избыточное влияние брадикинина, который как паракринный гормон через брадикиновые рецепторы B2 на поверхности эндотелиоцитов приводит к локальному патологическому расширению периферических кровеносных сосудов, увеличению проницаемости капилляров и выходу плазмы крови в окружающие ткани [10]. В норме продукция брадикинина происходит в результате расщепления высокомолекулярного кининогена плазменным калликреином, который активируется, в свою очередь, активным фактором XII Хагемана (XIIa). Этот каскад реакций составляет контактную систему активации основных протеолитических систем плазмы крови: гемокоагуляционной, фибринолитической, комплемента, калликреин-кининовой и ренин-ангиотензиновой. Для эффективного патогенетического купирования обо-

стрения HAO применяются синтетические блокаторы B2-рецепторов и антагонисты калликреина [1, 10].

Одним из важнейших регуляторов активности протеаз плазмы крови является ингибитор компонента C1 системы комплемента (официальная аббревиатура — SERPING1, устаревшие — C1NH, C1INH, C1I) — представитель суперсемейства ингибиторов сериновых (цистеиновых) протеаз (serpin — SERin Protease INhibitor, OMIM * 606860). С недостаточностью C1-ингибитора связаны наиболее распространенные формы HAO: HAO I типа со сниженной концентрацией сывороточного C1-ингибитора, и HAO II типа со сниженной активностью при нормальной концентрации C1-ингибитора (табл. 1). В патогенезе отеков при HAO I и II тип в условиях дефицита C1-ингибитора ключевую роль играет избыточная активность сериновых протеаз контактной кининформирующей системы (плазменного калликреина, фактора XIIa и XIIb) и в меньшей степени пламина, который выступает дополнительным триггером активации FXII [10, 11]. При дефиците C1-ингибитора также наблюдается повышенная активность протеаз классического и лектинового путей активации системы комплемента (протеазы C1r, MASP-1 и MASP-2), что обычно не проявляется клинически, но применяется при лабораторной диагностике HAO I и II типа [10]. Недостаточность C1-ингибитора обусловлена патогенными мутациями в кодирующем данный белок гене *SERPING1*, локализованном на хромосоме 11 (OMIM # 106100). Все формы HAO наследуются аутосомно-доминантно, за исключением редких случаев, вызванных специфическими рецессивными мутациями в гене *SERPING1* [12]. Мутации в гене *SERPING1* обнаруживаются у 95% пациентов с клиническими и биохимическими признаками HAO I и II типов [13].

У 11% российских детей с клиническими признаками HAO выявляются нормальные биохимические показате-

Таблица 1

Классификация наследственного ангионевротического отека

Тип HAO	Ген	Наследование	Диагностический маркер	Медиатор
С недостаточностью C1-ингибитора				
HAO типа I	<i>SERPING1</i>	Аутосомно-доминантное с высокой пенетрантностью, редко — аутосомно-рецессивное	Сниженные концентрации C4, C1-ингибитора и активность C1-ингибитора	Брадикинин
HAO типа II	<i>SERPING1</i>	Аутосомно-доминантное с высокой пенетрантностью, редко — аутосомно-рецессивное	Сниженная концентрация C4 и активность C1-ингибитора, нормальная концентрация C1-ингибитора	Брадикинин
С нормальными показателями C1-ингибитора				
HAO типа III	<i>F12</i>	Аутосомно-доминантное с низкой пенетрантностью, зависящей от пола	Патогенный вариант гена <i>F12</i>	Брадикинин
Без названия *	<i>ANGPT1</i>	Аутосомно-доминантное с высокой пенетрантностью *	Патогенный вариант гена <i>ANGPT1</i> *	Брадикинин *
Неизвестный	Не известен	Аутосомно-доминантное с неполной пенетрантностью, зависящей от пола	Не определен	Вероятно, брадикинин
Примечание. * — данные одной публикации исследования одной семьи с HAO				

ли С1-ингибитора [14], опубликованных данных о НАО, не связанного с дефицитом С1-ингибитора, у взрослых пациентов нет. Среди пациентов с НАО без дефицита С1-ингибитора 25% случаев обусловлены гетерозиготными мутациями в гене *F12*, кодирующем фактор XII Хагемана (FXII) и располагающемся на хромосоме 5 (OMIM # 610618) [13]. Данная генетическая форма заболевания представляет собой НАО III типа (табл. 1) — эстрогензависимая форма с преимущественной заболеваемостью лиц женского пола: пенетрантность заболевания женщин — 86,1%, мужчин — 4%, соотношение числа пациентов женского и мужского пола — 68 : 1 [15]. Показано, что мутации в гене *F12* при НАО III типа приводят к появлению в структуре FXII новых сайтов восприимчивости к ферментативному активирующему действию плазмينا, дефектные молекулы FXII быстро активируются плазмином и, избегая действия С1-ингибитора, вызывают повышенное формирование брадикинина [11]. Триггерное активирующее действие эстрогенов при НАО можно объяснить наличием эстроген-эффекторных элементов в промоторной области гена *F12*, посредством которых стимулируется синтез FXII [13, 16].

Для большинства пациентов с НАО с нормальным С1-ингибитором молекулярная причина заболевания остается неизвестной (в табл. 1 — неизвестный тип НАО). Данный тип НАО так же, как и НАО III типа, характеризуется неполной пенетрантностью и повышенной заболеваемостью среди представительниц женского пола, но эстрогензависимость отеков наблюдается значительно реже: соотношение числа пациентов женского и мужского пола — 6,3 : 1 [15]. Есть основания предполагать, что патофизиология НАО неизвестного типа связана с избыточным синтезом плазмينا из-за дефекта PAI-2 (ингибитора активатора плазминогена 2) и повышенной активации FXII плазмином [16]. В 2017 году методом массового параллельного секвенирования экзона в одной большой семье с неизвестным типом НАО выявлена вероятно патогенная миссенс-мутация в новом для моногенного заболевания гене *ANGPT1*, кодирующем ангиопоэтин-1 — представитель семейства факторов роста сосудов [17]. В постнатальном периоде ангиопоэтин-1 через рецепторы TIE-2 тирозинкиназного сигнального пути, экспрессирующиеся в эндотелиоцитах, участвует в модуляции ангиогенеза, поддерживая барьерную функцию эндотелия. Показано, что выявленная мутация приводит к нарушению связывания ангиопоэтина-1 с рецепторами TIE-2 и повышению сосудистой проницаемости [17]. В описанном исследовании в других 42 случаях неизвестного НАО мутаций в гене *ANGPT1* не были обнаружены, что подтверждает предположение о генетической гетерогенности НАО неизвестного типа [17].

Наследственный ангионевротический отек встречается редко, распространенность оценивается от 1 : 10 000 до 1 : 100 000 населения [2]. В 2012 году НАО включен в российский список орфанных заболеваний, для которых есть патогенетическое лечение, под шифром D 84.1 (де-

фект в системе комплемента). Молекулярная диагностика НАО I и II типа в России проводится с 2009 года, и в результате первого пилотного клинико-молекулярно-генетического исследования российских пациентов были описаны 18 молекулярно подтвержденных семейных и изолированных случаев НАО I и II типа, и выявлены 18 мутаций в гене *SERPING1*, в том числе одна рецессивная мутация [12, 18]. В настоящей работе представлены обновленные данные биоинформатического анализа 101 варианта последовательности гена *SERPING1*, выявленного среди 400 российских пациентов с НАО. Представленные данные могут использоваться для оптимизации диагностики заболевания, изучения гено-фенотипических корреляций и возможности прогнозирования клинического течения НАО I и II типа.

Материалы и методы

Материалы

В работе исследовались 439 образцов геномной ДНК пробандов и их родственников и 1 плода из 331 семьи, биологический материал которых (цельная венозная кровь или ворсины хориона) был направлен в лабораторию ДНК-диагностики с марта 2009 года по ноябрь 2017 года для молекулярной диагностики НАО I и II типа медицинскими учреждениями различных субъектов РФ и стран ближнего зарубежья: г. Москвы, Санкт-Петербурга, Московской, Белгородской, Иркутской, Ярославской, Мурманской, Сахалинской, Нижегородской, Самарской, Саратовской, Владимирской, Астраханской, Ленинградской, Псковской, Калининградской, Тамбовской, Тюменской, Орловской областей, Приморского, Алтайского, Ставропольского и Краснодарского края, республик Татарстан, Северная Осетия, Башкортостан и Бурятия, Украины и Белоруссии. В выборку включены образцы ДНК проведенного нами пилотного исследования, результаты которого были опубликованы ранее [12, 18].

Методы

Поиск мутаций в последовательности всех экзонов (1–8) и областей экзон-интронных соединений гена *SERPING* проводился методом прямого секвенирования по Сэнгеру амплифицированных фрагментов ДНК, подробное описание всех этапов которого, включая выделение геномной ДНК, последовательность праймеров, условия, приборы и реактивы для ПЦР и секвенирования, опубликовано ранее [18]. Обозначение вариантов гена *SERPING1* осуществляли в соответствии с международной номенклатурой HGVS (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>), референсная последовательность мРНК: NM_000062.2. Анализ клинического значения выявленных вариантов гена *SERPING1* выполнялся в соответствии с российскими и американскими рекомендациями по интерпретации данных, получаемых при секвенировании [19, 20]. Частота описанных вариантов среди пациентов с НАО и здоровых людей оценивалась с помощью баз данных HGMD® Pro-

fessional 2017.2 (<https://portal.biobase-international.com>), 1000 Genomes Project (<http://browser.1000genomes.org>), gnomAD () и NCBI ClinVar, dbSNP по состоянию на август 2017 года. Патогенность выявленных вариантов анализировали с применением Интернет-ресурсов, предсказывающих эффекты мутаций: Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org>), PROVEAN, SIFT (<http://provean.jcvi.org>), PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>) и NetGene2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>).

Для образцов ДНК, в которых не выявлены патогенные или вероятно патогенные варианты методом секвенирования, проведен анализ числа копий последовательности экзонов гена *SERPING1* для выявления протяженных экзонных делеций или дупликаций. Применялся метод количественной MLPA® с использованием коммерческого набора реактивов SALSA MLPA probemix P243-B1 *SERPING1*-F12 version A3/B1 (MRC-Holland, Нидерланды) согласно протоколу, предлагаемому производителем набора (MLPA® General Protocol, <http://www.mrc-holland.com>). Фрагменты ДНК, полученные в ходе MLPA®, разделяли с помощью прибора 3130 ABI genetic analyzer, интенсивность флуоресценции оценивали с использованием программного обеспечения Genemapper (Applied Biosystems, США). Количественный анализ полученных данных проводили с помощью программы Coffalyser.Net, доступной на сервере MRC-Holland (<https://coffalyser.wordpress.com>).

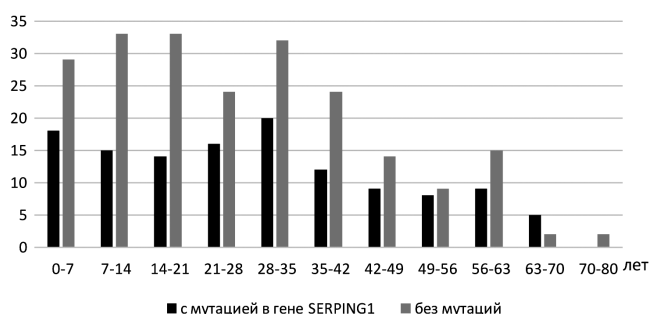


Рис. 1. Число исследованных в данной работе пациентов с НАО в разных возрастных группах.

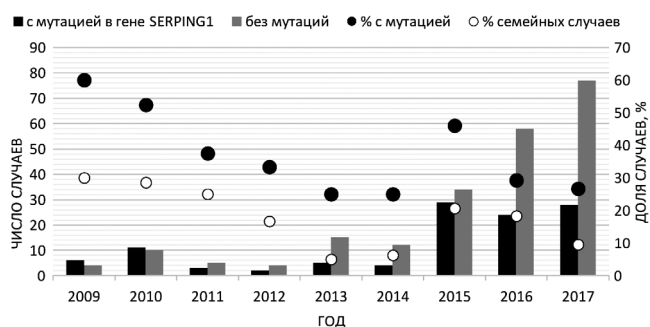


Рис. 2. Число молекулярно подтвержденных и неподтвержденных случаев НАО, а также доля молекулярно подтвержденных и семейных случаев НАО, исследованных в лаборатории ДНК-диагностики с 2009 по 2017 гг.

Результаты

Описание выборки пациентов

В работе исследованы образцы геномной ДНК 400 пациентов с ангиоотеками, 39 их родственников и 1 плода из 331 семьи: 279 изолированных и 52 семейных случая заболевания. Возраст пациентов варьировал от 2 мес. до 80 лет: средний возраст составил 27 лет, среднее отклонение от среднего — 15 лет (рис. 1). Пациенты были направлены в лабораторию для ДНК-диагностики НАО I/II типа. Образцы ДНК коллекционировались в течение 8,5 лет, при этом за последние 2,5 года отмечался значительный рост числа направленных пациентов (рис. 2).

Вариант гена *SERPING1*, являющийся или вероятно являющийся причиной НАО (табл. 2), обнаружен у 169 пациентов из 112 семей выборки, т.е. в 34% семейных или изолированных случаев заболевания. Среди семейных случаев такая мутация выявлена в 83% семей (43/52), среди изолированных больных — наблюдается достоверно реже, у 25% пациентов (69/279, $\chi^2 = 65$, $p < 0,0001$). Отмечено снижение доли молекулярно подтвержденных случаев НАО I и II типа с годами за счет увеличения числа пациентов без мутации в гене *SERPING1*, а также параллельное снижение доли семейных случаев заболевания среди обратившихся с 2009 по 2017 гг. (рис. 1). Так, в 2009 году мутация была выявлена в 60% случаев заболевания, в 2017 году — в 27% ($\chi^2 = 4$, $p = 0,027$); разница доли семейных случаев, исследованных в эти годы, статистически незначима ($\chi^2 = 3,8$, $p = 0,05$).

Половой состав выборки пациентов характеризуется преобладанием лиц женского пола в соотношении 1,8 : 1 (257 : 139 человек, $\chi^2 = 70$, $p < 0,0001$). Неравное соотношение наблюдается как среди пациентов с мутацией — 2 : 1 (112 : 56 человек, $\chi^2 = 37$, $p < 0,0001$), так и среди пациентов без мутации — 1,7 : 1 (145 : 83, $\chi^2 = 33$, $p < 0,0001$), приведенные соотношения среди пациентов с мутацией и без мутации статистически не различаются ($\chi^2 = 0,4$, $p = 0,53$). Принадлежность к определенному полу была определена не для всех пациентов выборки.

Варианты гена *SERPING1*

Всего среди пациентов выборки выявлена 91 мутация в гене *SERPING1*, являющаяся или вероятно являющаяся причиной НАО (табл. 2 и 3): 54 патогенных варианта (среди 31 семейного и 42 изолированных случаев), 25 вероятно патогенных вариантов (в 10 семейных и 17 изолированных случаях) и 12 вариантов неопределенного клинического значения (в 2 семейных и 10 изолированных случаях). Данные мутации были выявлены методом секвенирования по Сэнгеру всех экзонов и экзон-интронных соединений гена *SERPING1* в 98 семьях выборки (85 мутаций), и методом последующей количественной MLPA — еще в 14 семьях (6 мутаций).

Таблица 2

Варианты гена *SERPING1*, выявленные в настоящей работе среди российских пациентов с НАО методом секвенирования по Сэнгеру, являющиеся или вероятно являющиеся причиной НАО

Название	Эффект	Локализация в гене	Клиническое значение ^a	Критерии патогенности ^a	Число семей (пациентов) с вариантом в настоящей выборке	Описание ⁶
c.-161A>G ^{AP}	НТ	Экзон 1	ВП	PS3+PM2+PP1,5	1 (2)	HR080001
c.-22-1G>A	НТ	Инtron 1	П	PVS1++PM2+PP1,3,5	1 (2)	CS963044
c.-22-3C>G	НТ	Инtron 1	НЗ	PM2+PP1,3	1 (2)	Впервые
c.-23+30G>A	?	Инtron 1	НЗ	PM2+BP4	1 (1)	Впервые
c.5C>T	p.Ala2Val	Экзон 2	НЗ	PP1,2,5+BS1	1 (1)	CM087067
c.35T>G	p.Leu12Arg	Экзон 2	НЗ	PM2+PP2,5	1 (1)	CM141816
c.41delT	p.Leu14Argfs*65	Экзон 2	П	PVS1+PM2+PP3	1 (1)	Впервые
c.51+1G>T	НТ	Инtron 2	П	PVS1+PM2+PP3,5	2 (1+1)	CS122540
c.51+3A>G	НТ	Инtron 2	ВП	PS3+PM2+PP3,5	1 (1)	CS053487
c.52-1G>A	НТ	Инtron 2	П?	PVS1+PP3,5	1 (1)	CS087138
c.120_121delAG	p.Gly41Argfs*39	Экзон 3	П	PVS1+PM2+PP1,5	1 (2)	CD020870
c.136_139delinsTTG	p.Ala46Leufs*33	Экзон 3	П	PVS1+PM2+PP3	1 (1)	Впервые
c.312dupA	p.Pro105Thrfs*28	Экзон 3	П	PVS1+PM2+PP1,3	1 (2)	Впервые
c.322C>T	p.Gln108*	Экзон 3	П	PVS1+PM2+PP1,3	1 (2)	Впервые
c.377_378delCT	p.Pro126Argfs*6	Экзон 3	П	PVS1+PM2+PP1,3	1 (2)	Впервые
c.382_391dup10	p.Ser131Tyrfs*5	Экзон 3	П	PVS1+PM2+PP3	1 (1)	Впервые
c.382dupA	p.Thr128Asnfs*5	Экзон 3	П	PVS1+PM2+PP3	1 (1)	Впервые
c.399_506del108	p.Leu133_Ala168del36	Экзон 3	ВП	PS(PM4)+PM2+PP3	1 (1)	Впервые
c.452_463del12	p.Leu151_Tyr454del4	Экзон 3	ВП	PS(PM4)+PM2+PP3	1 (1)	Впервые
c.458T>G	p.Leu153Arg	Экзон 3	ВП	PM2,5+PP1,2,3	1 (2)	Впервые
c.461A>G	p.Tyr154Cys	Экзон 3	ВП	PM2,5+PP1,2,3,5	1 (2)	CM117767
c.468delC	p.Phe157Serfs*4	Экзон 3	П	PVS1+PM2+PP1,3	1 (4)	Впервые
c.506T>C ^{de novo}	p.Phe169Ser	Экзон 3	П	PS2+PM2+PP1,2,3,5	1 (2)	CM960215
c.508delT	p.Ser170Profs*41	Экзон 3	П	PVS1+PM2+PP3,5	1 (1)	CD153620
c.523_526delinsTG	p.Ala175Trpfs*81	Экзон 3	П	PVS1+PM2+PP3	1 (1)	Впервые
c.538C>T	p.Gln180*	Экзон 3	П	PVS1+PM2+PP1,3	1 (2)	Впервые
c.550G>A	p.Gly184Arg или НТ	Экзон 3	П	PM2,5+PS3+PP1,2,3,5	2 (1+2)	BM1165483
c.550+1G>A	НТ	Инtron 3	П	PVS1+PM2+PP3,5	1 (1)	CS033512
c.550+2T>A	НТ	Инtron 3	П	PVS1+PM2+PP3	1 (1)	Впервые
c.550+5G>A	НТ?	Инtron 3	НЗ	PM2+PP3,5	1 (1)	CS961499
c.578T>C	p.Leu193Pro	Экзон 4	НЗ	PM2+PP2,3,5	1 (1)	CM053408
c.614G>A	p.Cys205Tyr	Экзон 4	ВП	PM2,5+PP1,2,3,5	1 (1)	CM004569
c.622C>T	p.Gln208*	Экзон 4	П	PVS1+PM2+PP3	1 (1)	Впервые
c.623_624insA	p.Ala209Glyfs*48	Экзон 4	П	PVS1+PM2+PP1,3,5	1 (2)	Впервые
c.664_667del4	p.Ser222Argfs*10	Экзон 4	П	PVS1+PM2+PP3	1 (1)	Впервые
c.674T>C	p.Phe225Ser	Экзон 4	ВП	PM2+PP1,2,3,5	1 (2)	CM087074
c.685+2T>A	НТ	Инtron 4	П	PVS1+PS3+PM2+PP1,3,5	2 (1+1)	CS1313350
c.686-2A>G	НТ	Инtron 4	П	PVS1+PM2+PP3	1 (1)	Впервые
c.686A>C	p.Asp229Ala или НТ	Экзон 5	НЗ	PM2+PP2,3	1 (1)	Впервые
c.706T>G	p.Phe236Val	Экзон 5	ВП	PM2,5+PP2,3,5	1 (1)	CM178833

Таблица 2 (продолжение)

Название	Эффект	Локализация в гене	Клиническое значение ^a	Критерии патогенности ^a	Число семей (пациентов) с вариантом в настоящей выборке	Описание ⁶
c.718T>C	p.Ser240Pro	Экзон 5	H3	PM2+PP1,2,3	1 (2)	Впервые
c.728T>C	p.Leu243Pro	Экзон 5	H3	PM2+PP2,3,5	1 (1)	CM083119
c.751delC	p.Leu251*	Экзон 5	П	PVS1+PM2+PP1,5	1 (1)	CD961871
c.773_784del12	p.Asn258_Leu261del4	Экзон 5	ВП	PS(PM4)+PM2+PP1,3	1 (2)	Впервые
c.808_809delinsCAA	p.Thr270Glnfs*35	Экзон 5	П	PVS1+PM2+PP1	2 (1+2)	Впервые
c.808A>C	p.Thr270Pro	Экзон 5	H3	PM2+PP2,3	1 (1)	Впервые
c.809C>A	p.Thr270Asn	Экзон 5	H3	PM2+PP2,3	1 (1)	Впервые
c.846delC	p.Ser283Profs*13	Экзон 5	П	PVS1+PM2+PP3	1 (1)	Впервые
c.889+89A>G	?	Инtron 5	H3	PM2+BP4	1 (1)	Впервые
c.908T>C	p.Phe303Ser	Экзон 6	ВП	PM2,5+PP1,2,3,5	2 (1+3)	CM087078
c.950dupA ^{de novo}	p.Asn317LysfsX10	Экзон 6	П	IVS1+PS2+PM2+PP1	1 (3)	CI084329
c.953C>G	p.Ser318*	Экзон 6	П	PVS1+PM2+PP1,3	1 (2)	CM133510
c.971T>A ^{cis}	p.Met324Lys	Экзон 6	ВП	PM2,5+PP1,2,3	1 (2)	Впервые
c.971T>G	p.Met324Arg	Экзон 6	ВП	PM2,5+PP1,2,3,5	1 (2)	CM083107
c.981_987del7	p.Lys328Thrfs*11	Экзон 6	П	PVS1+PM2+PP3	1 (1)	Впервые
c.989A>G	p.Tyr330Cys	Экзон 6	ВП	PM2,5+PP2,3	1 (1)	Впервые
c.998C>A ^{cis}	p.Ala333Asp	Экзон 6	ВП	PM2,5+PP1,2,3,5	1 (2)	CM119864
c.1029+1delG	HC	Инtron 6	П	PVS1+PM2+PP1,3	1 (4)	Впервые
c.1033G>A	p.Gly345Arg	Экзон 7	ВП	PM2,5+PP2,3,5	1 (1)	CM053410
c.1058T>C	p.Leu353Pro	Экзон 7	ВП	PM2+PP1,2,3,5	1 (1)	CM087081
c.1106delA	p.Glu368Argfs*57	Экзон 7	П	PVS1+PM2+PP1,5	1 (1)	CD033556
c.1108A>G, 1109_1114del6, 1116G>T, 1118_1159dup42	?	Экзон 7	П	PVS1+PM2+PP1	1 (2)	Впервые
c.1127_1130dupC ^{TTC}	p.Val378Phefs*48	Экзон 7	П	PVS1+PM2+PP3	1 (1)	Впервые
c.1153A>T	p.Lys385*	Экзон 7	П	PVS1+PM2+PP1	1 (2)	Впервые
c.1157_1158delTG	p.Leu386Argfs*38	Экзон 7	П	PVS1+PM2+PP1	1 (2)	Впервые
c.1188_1189delinsC	p.Thr397Hisfs*7	Экзон 7	П	PVS1+PM2+PP3	1 (1)	Впервые
c.1195C>T	p.Pro399Ser	Экзон 7	ВП	PM2,5+PP2,3,5	1 (1)	CM973244
c.1196C>T	p.Pro399Leu	Экзон 7	ВП	PM2,5+PP1,2,3,5	1 (1)	CM053407
c.1229T>C	p.Leu410Pro	Экзон 7	ВП	PM2+PP1,2,3,5	1 (1)	CM087087
c.1249+2T>G	HC	Инtron 7	П	PVS1+PM2+PP1,3	1 (3)	Впервые
c.1269delT	p.Tyr423*	Экзон 8	П	PVS1+PM2+PP3	1 (1)	Впервые
c.1287delG	p.Leu430*	Экзон 8	П	PVS1+PM2+PP3	1 (1)	Впервые
c.1289T>G	p.Leu430Arg	Экзон 8	ВП	PM2,5+PP2,3	1 (1)	Впервые
c.1308delT	p.Gln437Argfs*13	Экзон 8	П	PVS1+PM2+PP3	1 (1)	Впервые
c.1309C>T	p.Gln437*	Экзон 8	П	PVS1+PM2+PP1,3,5	1 (2)	CM141817
c.1356dupT	p.Gly453Trpfs*20	Экзон 8	П	PVS1+PM2+PP3	1 (1)	Впервые
c.1393_1394delGC	p.ALA465Profs*7	Экзон 8	П	PVS1+PM2+PP3	1 (1)	Впервые
c.1396C>T ^{de novo}	p.Arg466Cys	Экзон 8	П	PS4+PM1,2,5+PP1,2,3,5	6 (1+1+1+2+2+3)	CM890026

Таблица 2 (окончание)

Название	Эффект	Локализация в гене	Клиническое значение ^a	Критерии патогенности ^a	Число семей (пациентов) с вариантом в настоящей выборке	Описание ^b
c.1397G>A	p.Arg466His	Экзон 8	П	PS4+PM1,2,5+PP1,2,3,5	1 (2)	CM890025
c.1430T>C	p.Phe477Ser	Экзон 8	ВП	PM2,5+PP1,2,3	1 (1)	CM960227
c.1450C>T	p.Gln484*	Экзон 8	П	PVS1+PM2+PP3	1 (1)	CM921030
c.1466C>G	p.Pro489Arg	Экзон 8	ВП	PM2+PP1,2,3,5	1 (3)	CM950183
c.1480C>T	p.Arg494*	Экзон 8	П	PVS1+PM2+PP1,3,5	4 (1+1+2+2)	CM960228
c.1490A>G	p.Asp497Gly	Экзон 8	ВП	PM2+PP1,2,3,5	2 (1+2)	CM128692
c.1492C>T	p.Pro498Ser	Экзон 8	ВП	PM2,5+PP1,2,3	1 (1)	CM960229

^a обозначения приведены в соответствии с американскими и российскими рекомендациями по интерпретации и классификации вариантов нуклеотидной последовательности (19,20), ^b указанные номера соответствуют идентификационным номерам описания вариантов в базе HGMD® Professional 2017.2, ^{AP} рецессивный вариант, ^{cis} варианты в настоящей работе обнаружены в *cis*-положении (на одной хромосоме) в одном семейном случае НАО, ^{de novo} вариант, для которого подтверждено происхождение *de novo* в семье, исследованной в настоящей работе. НТ — нарушение транскрипции, НС — нарушение сплайсинга, П — патогенный, ВП — вероятно патогенный, НЗ — неопределенного значения.

Таблица 3

Патогенные протяженные экзонные делеции в гене *SERPING1*, выявленные в настоящей работе среди российских пациентов с НАО методом количественной MLPA

Затронутые делецией экзоны	Число семей (пациентов) с вариантом в настоящей выборке
Экзон 1	1(2)
Экзоны 3—7	1(3)
Экзон 4	6(1+1+1+1+2+2)
Экзон 7	3(1+1+2)
Экзон 8	2(1+2)
Экзоны 1—8	1(1)

Среди мутаций, являющихся или вероятно являющихся причиной НАО в выборке российских пациентов, наиболее распространены миссенс-мутации (35%), также часто встречаются делеции, мутации в сайтах сплайсинга и нонсенс-мутации (16%, 15% и 12%), реже — инсерции, протяженные делеции и indels (8%, 7% и 4%), в единичных случаях наблюдалась однонуклеотидная замена в промоторе или сложная перестройка в кодирующей области. В целом, спектр мутаций в исследуемой выборке пациентов не отличается от наблюдаемого в базах ранее описанных патогенных или вероятно патогенных мутаций в гене *SERPING1* (рис. 3). Не выявлены горячие экзоны с мутациями — мутации в последовательности экзонов гена *SERPING1* локализованы равномерно.

Обнаружены 44 ранее не описанных варианта гена *SERPING1*, что составляет 48% выявленных в настоящей работе мутаций (табл. 2). В исследуемой выборке наблюдались более чем в одной неродственной семье 8 вариантов (табл. 2). Среди повторяющихся вариантов оказались 7 описанных (c.1396C>T, c.1480C>T, c.1490A>G, c.51+1G>T, c.550G>A, c.685+2T>A и c.908T>C) и 1 ранее не описанный — c.808_809delins-CAA. Для трех ранее описанных в зарубежной литерату-

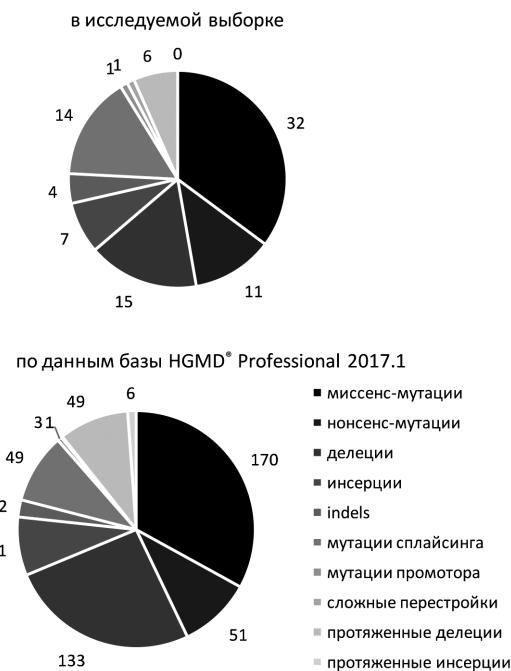


Рис. 3. Число мутаций определенного структурного типа в гене *SERPING1*, являющихся или вероятно являющихся причиной НАО.

ре патогенных вариантов с.506T>C (p.Phe169Ser), с.950dupA и с.1396C>T (p.Arg466Cys) в семейном случае нашей выборки подтверждено происхождение *de novo* в результате исследования здоровых родителей пробанда (первого случая НАО в семье), для других мутаций подобный анализ в настоящей работе не проводили из-за недоступности биоматериала родителей пробанда. При анализе выявленного спектра протяженных делеций отмечено, что наиболее часто, в 79% случаев, встречаются делеции, затрагивающие отдельно экзон 4, либо экзон 7, либо экзон 8, в остальных случаях делеция охватывает другие экзоны, в том числе более одного экзона (табл. 3). Геномные границы выявленных протяженных делеций не определяли.

Также в исследованной выборке пациентов с НАО были обнаружены 10 доброкачественных или вероятно доброкачественных вариантов гена *SERPING1*. Среди пациентов без мутаций, указанных в табл. 2 и 3, встретились следующие 5 описанных доброкачественных или вероятно доброкачественных вариантов гена: с.-107_-106insC (rs28362939), с.-24G>C (rs112290300), с.142A>G (rs11546661), с.751C>T (rs35788383) и с.849C>T (rs143760635). Три наиболее частых доброкачественных варианта с.-21T>C (rs28362944), с.1030-20A>G (rs2511988) и с.1438G>A (rs4926) наблюдались как у пациентов без других мутаций в гене *SERPING1*, так и у пациентов в сочетании с патогенным или вероятно патогенным вариантом гена. Вариант с.519C>T (rs776788704), описанный в базе dbSNP как вариант с неустановленным клиническим значением, в настоящей выборке встретился в семейном случае НАО в транс-положении с другим вариантом неопределенного значения с.-22-3C>G (наблюдался у пробанда, но у больной матери пробанда не выявлен), и по совокупности имеющихся данных классифицирован как вероятно доброкачественный (BS4+BP4,5). Еще один вариант с.-100C>G описан в базе HGMD (CR961721) как обуславливающий заболевание и в базе dbSNP (rs578018379) как вариант с неустановленным клиническим значением, в изученной выборке обнаружен у пациента в сочетании с вероятно патогенным вариантом с.1196C>T и в соответствии с литературными и собственными данными классифицирован как вероятно доброкачественный (PP1+PP5+BS1+BP5).

Обсуждение

Многолетний опыт врачей всего мира показал, что клиническая картина наследственных и приобретенных неаллергических ангиоотек не отличается, тяжесть клинического течения сильно варьирует у разных пациентов, у членов одной семьи, нередко у одного пациента в разные периоды обострения. При этом на основании дополнительного анализа семейной истории и биохимических показателей крови пациента (количество антигенов и функциональная активность C1-ингибитора, ком-

понентов системы комплимента C1q и C4) в большинстве случаев можно диагностировать НАО. Поэтому генетическое исследование не является диагностическим подходом первой линии для подтверждения НАО I и II типа [13]. Однако во многих других случаях генетический анализ остается незаменимым. Во-первых, молекулярная диагностика необходима для подтверждения НАО с нетипичной клинической картиной ангиоотека, с сомнительными лабораторными показателями исследования крови. Наиболее часто с такой проблемой сталкиваются в случаях с детьми, особенно до двухлетнего возраста, поскольку в этом возрасте референсные значения количества и активности C1-ингибитора намного ниже, чем у взрослых. Кроме того, у детей частыми симптомами НАО являются желудочно-кишечные проявления, и в этих случаях необходима соответствующая дифференциальная диагностика [13]. Во-вторых, в обязательном порядке рекомендуется проводить генетическое исследование детей и других родственников пациентов с подтвержденным НАО для досимптоматической диагностики заболевания и принятия своевременных превентивных мер. Установлено, что досимптоматическая диагностика НАО снижает в 3–9 раз риск смерти пациента от асфиксии [5]. В-третьих, использование молекулярных методов неизбежно при планировании и проведении пренатального исследования плода, преимплантационной диагностики эмбрионов в протоколах с применением вспомогательных репродуктивных технологий

Согласно данным ряда зарубежных исследований, доля спорадических пациентов НАО I/II типа (без семейной истории заболевания) составляет 20–33% от всех случаев НАО [21, 22]. При этом эффективность молекулярной диагностики НАО I и II типа составляет 95% при использовании секвенирования по Сэнгеру и методов выявления протяженных делеций, дупликаций и других крупных перестроек гена *SERPING1* [13]. В исследованной в данной работе выборке среди случаев с мутациями в гене *SERPING1* наблюдается более высокая доля изолированных пациентов — 62% — по сравнению с ожидаемой долей спорадических пациентов, что свидетельствует о вероятном присутствии значительного числа семейных случаев НАО наряду со спорадическими пациентами в группе изолированных случаев. В настоящей работе эффективность поиска мутаций в гене *SERPING1* в семейных случаях НАО (83%) оказалась немного ниже установленной зарубежными авторами и значительно меньшей — среди изолированных пациентов (25%), что можно объяснить лишь клинической гипердиагностикой НАО I и II типа, преимущественно наблюдаемой у изолированных пациентов. Гипердиагностику заболевания можно объяснить как недостаточной осведомленностью многих врачей о клинических особенностях НАО I и II типа, ошибками в результатах биохимического исследования крови пациентов, так и возрастающей актуальностью дифференциальной и до-

симптоматической диагностики НАО в связи со сравнительно недавним появлением в нашей стране доступного и эффективного специфического патогенетического метода лечения данного заболевания, и назначением ДНК-анализа с этими целями.

Согласно обзорным зарубежным литературным данным, заболеваемость НАО I и II типа среди пациентов женского и мужского пола не отличается [3]. Однако в исследованной в настоящей работе группе пациентов с мутацией в гене *SERPING1* наблюдается двукратное преобладание лиц женского пола. Подобное неравное соотношение полов в выборках пациентов с НАО I/II типа отмечено и в других исследовательских работах в разных странах (Испании, Турции, Румынии, Венгрии) [23—25]. Преобладание пациенток женского пола, пусть и значительно более выраженное по сравнению с выборками с НАО I/II типа, наблюдается в выборках эстрогензависимых НАО III и неизвестного типов (табл. 1), что обусловлено неполной пенетрантностью заболевания данных типов при значительно более низкой пенетрантности у мужчин, чем у женщин [15]. Несмотря на то, что пенетрантность НАО I/II типа оценивается как очень высокая [13], возможно, пенетрантность заболевания у пациентов мужского пола немного меньше, чем у пациенток. Редкие сообщения об отсутствии клинических признаков НАО у некоторых индивидов с мутацией в гене *SERPING1* существуют в литературе [24], однако прицельное исследование пенетрантности НАО I/II типа, в том числе для лиц разного пола, не проводилось. Можно предположить, что преобладание пациенток женского пола в выборках НАО I/II типа связано также с более высокой обращаемостью женщин к врачу, однако опубликованных данных, подтверждающих данное предположение, нет.

Спектр мутаций гена *SERPING1* среди российских пациентов с НАО не отличается от такового в зарубежных выборках (рис. 3) [24]. Наиболее часто встречаются внутригенные точковые мутации всех типов, с преобладанием миссенс-мутаций, делеций и замен в сайтах сплайсинга (рис. 3), выявленные в 89% случаев НАО I и II типа настоящей выборки. Для гена *SERPING1* характерна высокая встречаемость протяженных делеций/дупликаций (рис. 3), обусловленная наличием множества Alu-повторов в последовательности почти всех интронов гена — «горячих точек» для возникновения негомологичной рекомбинации [13]. В настоящей работе протяженные делеции детектировались методом анализа количественной MLPA экзонов гена и составляют минимум 7% от всех выявленных мутаций гена. Данная оценка может быть заниженной в связи с тем, что точные границы делеций не определялись и одинаковые результаты анализа MLPA в разных семьях расценивались как наличие повторяющейся мутации (табл. 3), хотя на самом деле эти мутации могут быть разными. Среди пациентов с НАО I и II типа протяженные делеции

выявлены в 11% случаев, схожие оценки приводятся зарубежными исследователями — 11—17% [13, 24].

Ген *SERPING1* является ярким примером последовательности ДНК с мутагенной нестабильностью: содержит множество повторяющихся элементов в интронах, характеризуется повышенной скоростью мутагенеза в связи с локализацией вблизи центромеры — наиболее быстро эволюционирующей области генома эукариот, характеризуется наличием высокой встречаемости сайтов CpG — «горячих точек» для дезаминирования [13]. Этим объясняется большая доля мутаций *de novo* в гене *SERPING1* — 25% среди случаев НАО I/II типа [21]. В выборке российских пациентов 48% мутаций в гене *SERPING1* оказались новыми, ранее не описанными в литературе, также в трех из трех исследованных случаях подтверждено происхождение мутаций *de novo* в семье, при этом *de novo* мутации были ранее описаны в зарубежных семьях с НАО. Один из этих вариантов с.1396C>T (p.Arg466Cys) является хорошо известным и наиболее часто повторяющимся в неродственных семьях из разных стран, а аминокислота Arg466 — центральная в активном центре C1-ингибитора — «горячей точкой» для аминокислотных замен [13]. Вероятно, и две другие мутации, с.506T>C (p.Phe169Ser) и с.950dupA, тоже являются «горячими точками».

Опыт молекулярной диагностики НАО показал высокую актуальность исследования членов семьи пробанда, как больных НАО, так и без признаков данного заболевания. Для 22% вариантов гена *SERPING1* в настоящей работе удалось уточнить патогенность выявленных мутаций благодаря дополнительному исследованию членов семьи пациентов с НАО, в ходе которого был проведен сегрегационный анализ и/или оценка происхождения мутации *de novo*, фазы локализации двух мутаций в одном генотипе. Несмотря на то, что для преобладающего большинства пациентов с НАО I и II типа выявлен патогенный или вероятно патогенный вариант, в 11% семей обнаружен вариант неопределенного клинического значения, наличие в генотипе которого не может быть использовано для постановки диагноза НАО, и патогенность мутаций в данных семьях можно уточнить накоплением данных семейного анализа, проведением популяционных либо функциональных исследований мутации *in vitro* или *in vivo*.

Список литературы

1. Данилычева ИВ, Елисютина ОГ, Курбачева ОМ и др. Аллергология. Федеральные клинические рекомендации. Москва: «Фармас-Принт Медиа»; 2014. 126 р.
2. Cicardi M, Aberer W, Banerji A, et al. Classification, diagnosis, and approach to treatment for angioedema: consensus report from the Hereditary Angioedema International Working Group. *Allergy*. 2014;69(5):602-616.
3. Zingale LC, Beltrami L, Zanichelli A, et al. Angioedema without urticaria: a large clinical survey. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*. 2006;175(9):1065-1070.

4. Weller K, Groffik A, Magerl M, et al. Development and construct validation of the angioedema quality of life questionnaire. *Allergy*. 2012;67(10):1289-1298.
5. Bork K, Hardt J, Witzke G. Fatal laryngeal attacks and mortality in hereditary angioedema due to C1-INH deficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2012;130(3):692-697.
6. Bernstein JA, Cremonesi P, Hoffmann TK, et al. Angioedema in the emergency department: a practical guide to differential diagnosis and management. *International journal of emergency medicine*. 2017;10(1):15.
7. Lin RY, Cannon AG, Teitel AD. Pattern of hospitalizations for angioedema in New York between 1990 and 2003. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2005;95(2):159-166.
8. Bork K. Angioedema. *Immunology and allergy clinics of North America*. 2014;34(1):23-31.
9. Lewis LM. Angioedema: etiology, pathophysiology, current and emerging therapies. *The Journal of emergency medicine*. 2013;45(5):789-796.
10. Longhurst H, Cicardi M. Hereditary angio-oedema. *Lancet*. 2012;379(9814):474-481.
11. de Maat S, Bjorkqvist J, Suffritti C, et al. Plasmin is a natural trigger for bradykinin production in patients with hereditary angioedema with factor XII mutations. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2016;138(5):1414-1423 e1419.
12. Дмитриева АВ, Латышева ТВ, Поляков АВ и др. Случай аутосомно-рецессивного наследования ангионевротического отека I типа. *Российский аллергологический журнал*. 2012;1(1):98-101.
13. Germeis AE, Speletas M. Genetics of Hereditary Angioedema Revisited. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2016;51(2):170-182.
14. Кузьменко НБ, Дибирова СА, Варламова ТВ и др. Принципы диагностики и лечения наследственного ангионевротического отека (обзор литературы). *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. 2016;15(1):54-60.
15. Bork K, Wulff K, Witzke G, et al. Hereditary angioedema with normal C1-INH with versus without specific F12 gene mutations. *Allergy*. 2015;70(8):1004-1012.
16. Zuraw BL, Christiansen SC. HAE Pathophysiology and Underlying Mechanisms. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2016;51(2):216-229.
17. Bafunno V, Firinu D, D'Apolito M, et al. Mutation of the angiotensin-converting enzyme 1 gene (ANGPT1) associates with a new type of hereditary angioedema. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2017.
18. Дмитриева АВ, Блинец ЕА, Медуницына ЕН и др. Генетические аспекты рецидивирующих ангиоотёков. *Медицинская генетика*. 2011;10(8):43-48.
19. Рыжкова ОП, Кардымон ОЛ, Прохорчук ЕБ и др. Руководство по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS). *Медицинская генетика*. 2017;16(7):4-17.
20. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-424.
21. Pappalardo E, Cicardi M, Duponchel C, et al. Frequent de novo mutations and exon deletions in the C1 inhibitor gene of patients with angioedema. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2000;106(6):1147-1154.
22. Roche O, Blanch A, Duponchel C, et al. Hereditary angioedema: the mutation spectrum of SERPING1/C1NH in a large Spanish cohort. *Hum Mutat*. 2005;26(2):135-144.
23. Kesim B, Uyguner ZO, Gelincik A, et al. The Turkish Hereditary Angioedema Pilot Study (TURHAPS): the first Turkish series of hereditary angioedema. *International archives of allergy and immunology*. 2011;156(4):443-450.
24. Speletas M, Szilagyi A, Psarros F, et al. Hereditary angioedema: molecular and clinical differences among European populations. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2015;135(2):570-573.
25. Bafunno V, Bova M, Loffredo S, et al. Mutational spectrum of the c1 inhibitor gene in a cohort of Italian patients with hereditary angioedema: description of nine novel mutations. *Ann Hum Genet*. 2014;78(2):73-82.