

Клиническая и генетическая характеристика пациентов с недифференцированными формами нарушений интеллектуального развития и хромосомными микродупликациями

Беляева Е.О.* , Назаренко Л.П., Лебедев И.Н.

Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск; *e-mail: eo-belyaeva@mail.ru

Актуальность: В настоящее время вариации числа копий участков ДНК рассматриваются как одна из ведущих причин интеллектуальных расстройств. У пациентов с умственной отсталостью и нарушениями развития описано порядка 230 микроделеционных и только около 80 микродупликационных синдромов. В связи с преобладанием микроделений с доказанной патогенетической значимостью возникает вопрос о недооценке роли микродупликаций в реализации патологических состояний. **Цель:** поиск патогенетически значимых хромосомных микродупликаций у пациентов с недифференцированными формами интеллектуальных расстройств и характеристика их клинических проявлений. **Материалы и методы:** На микрочипах (8x60K, Agilent Technologies) проведено молекулярное кариотипирование 200 пациентов в возрасте от 2 до 18 лет с задержкой развития (до 5 лет), легкой степенью умственной отсталости (IQ 50–70), дизморфиями и/или врожденными аномалиями. Верификация и анализ происхождения микродупликаций осуществлены с использованием ПЦР в реальном времени. **Результаты:** В обследованной выборке из 200 больных у 70 индивидов (35%) не обнаружены вариации числа повторов ДНК, у 63 (31,5%) зарегистрированы доброкачественные варианты. У 67 пациентов (33,5%) установлен широкий спектр патогенных и потенциально патогенных вариаций числа копий участков ДНК (CNVs), не выявленных при стандартном цитогенетическом кариотипировании. У 39 детей-носителей CNVs с вероятно патогенетической значимостью идентифицировано 14 делеций и 25 дупликаций, что в общей группе пациентов составило соответственно 7% и 12,5%. 18 человек (9%) имели сочетания различных типов CNVs (с патогенным и потенциально патогенным значением). 10 больным установлен диагноз микроделеционного/микродупликационного синдрома, обусловив частоту встречаемости патогенных CNVs, ассоциированных с известными ММС, равную 5%. **Выводы:** Нами определены частота, спектр, происхождение клинически значимых хромосомных микродупликаций у пациентов с недифференцированными формами интеллектуальных расстройств и охарактеризованы их клинические проявления. Своевременная молекулярно-цитогенетическая диагностика важна для идентификации причины заболевания и качественного медико-генетического консультирования семей.

Ключевые слова: недифференцированные интеллектуальные нарушения, матричная сравнительная геномная гибридизация, хромосомные микродупликации.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

Clinical and genetic characteristics of patients with idiopathic intellectual disability and chromosomal microduplications

Belyaeva E.O.* , Nazarenko L.P., Lebedev I.N.

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of Russian Academy of Sciences, Tomsk.

* e-mail: eo-belyaeva@mail.ru

Introduction: Copy number variation is regarded as one of the leading genetic causes of intellectual disorders. About 230 microdeletions and only about 80 microduplication syndromes are described in patients with intellectual disability and developmental disorders. In connection with the prevalence of microdeletions with proven pathogenetic significance, the question arises about underestimation of the role of microduplications in the realization of pathological conditions. **Aim:** search for pathogenetically significant chromosomal microduplications in patients with idiopathic intellectual disability and characterization of their clinical manifestations. **Materials and Methods:** Using 8x60K arrays the molecular karyotyping for 200 children of 2–18 years old with developmental delay, intellectual disability (IQ 50–70), and dysmorphic features / congenital anomalies was performed. Verification and analysis of the origin of microduplications were carried out using PCR-RT. **Results:** Seventy patients (35%) showed no clinical significant CNV, and 63 (31.5%) reported benign variants. A wide spectrum of pathogenic and potentially pathogenic CNVs was identified for 67 patients (33.5%), not detected with standard karyotyping. In 39 children of CNVs with probable pathogenetic significance, 14 deletions and 25 duplications were identified, which in the general group of patients consist of 7% and 12.5%, respectively. Eighteen patients (9%) had combinations of different types of CNVs (with pathogenic and potentially pathogenic significance). Ten pa-

tients (5%) were diagnosed with a microdeletion / microduplication syndrome. **Conclusions:** We determined the frequency, spectrum, origin of clinically significant chromosomal microduplications in patients with idiopathic intellectual disability and characterized its clinical manifestations. Timely molecular cytogenetic diagnosis is important for elucidating the causes of the disease and providing quality medical genetic counseling for the family.

Key words: undifferentiated intellectual disability, array comparative genomic hybridization, chromosomal microduplications.

Введение

Умственная отсталость (УО) — возникшая в раннем детском возрасте (до 3 лет) задержка развития психики, проявляющаяся нарушением интеллекта и социальной адаптации [1]. Выделяют четыре степени УО (легкая, средняя, тяжелая, глубокая), чаще из которых в популяции регистрируется легкая форма (85%), с уровнем снижения интеллекта от 70 до 50—55 [2]. Согласно современным представлениям умственную неполноценность концептуализируют как «расстройства интеллектуального развития», подчеркивая, что она является не отдельной нозологической единицей, а сложным симптомокомплексом, характерным для крайне гетерогенной группы болезней, имеющих разнообразную и сложно классифицируемую структуру клинических проявлений и сопутствующих хронических заболеваний. В связи с этим, проблема этиопатогенетических взаимоотношений данных патологических состояний и их дифференциальная диагностика остается одной из самых острых в практической деятельности врачей разных специальностей. Широкое использование в клинической практике высокоразрешающих технологий (методов матричной сравнительной геномной гибридизации (аCGH), секвенирования нового поколения (NGS)) привело к более точному обнаружению мелких вариации числа копий участков ДНК (copy number variation, CNV) по всему геному и описанию новых синдромов, связанных с субмикроскопическими хромосомными аберрациями, имеющими размер до 5 млн п.н. (синдромы микроделетий и микродuplicаций). Так, у пациентов с умственной отсталостью и нарушениями развития описано более 230 микроделеционных, но только порядка 80 микродuplicационных синдромов [3]. Обращает на себя внимание тот факт, что микродuplicаций с доказанной клинической значимостью примерно в три раза меньше, чем микроделетий, в связи с чем возникает вопрос о недооценке их роли в реализации патологических состояний.

Настоящая работа направлена на поиск патогенетически значимых хромосомных микродuplicаций у пациентов с недифференцированными формами интеллектуальных расстройств и характеристику их клинических проявлений.

Материалы и методы

Выборка включила 200 пациентов в возрасте от 2 до 18 лет, страдающих задержкой развития (до 5 лет), умственными нарушениями (легкая степень умственной от-

сталости с уровнем снижения интеллекта от 70 до 50—55), имеющих дизморфические черты и/или врожденные аномалии. Больные обследованы методом аCGH с использованием ДНК-микрочипов Human Genome CGH SurePrintG3 HumanCGH 8x60K (Agilent Technologies, США), согласно рекомендациям производителя [4]. Результаты обработаны в программе Cytogenomics (v3.0.2.11) (Agilent Technologies, США). Интерпретация CNV проведена с использованием Базы данных геномных вариантов (DGV) и онлайн-версии Каталога наследственных болезней «Менделеевское наследование у человека» (OMIM). Патогенетически значимые микродuplicации подтверждены методом количественной ПЦР в реальном времени на приборе AriaMXReal-TimePCRSytem (Agilent Technologies, США), и определено их происхождение. Исследование одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ и проводилось после получения информированного согласия от родителей пробандов. Работа выполнена на базе Центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» НИИ медицинской генетики ТНИМЦ с использованием ресурсов биобанка «Биобанк населения Северной Евразии».

Результаты и обсуждение

По данным проведенного молекулярно-цитогенетического исследования у 70 индивидов (35%) не обнаружены CNVs, у 63 (31,5%) зарегистрированы доброкачественные варианты. У 67 пациентов (33,5%) исследуемой группы установлен широкий спектр патогенных и потенциально патогенных CNVs, не выявленных при стандартном цитогенетическом кариотипировании. Среди них идентифицировано 14 делеций и 25 дупликаций, что в общей группе пациентов с синдромальными интеллектуальными нарушениями составило соответственно 7% и 12,5%. Ещё 18 человек (9%) имели сочетания различных типов CNVs (с патогенным и потенциально патогенным значением). 10 больным установлен диагноз микроделеционного/микродuplicационного синдрома, обусловив частоту встречаемости патогенных CNVs, ассоциированных с известными ММС, равную 5%. Данный показатель свидетельствует о том, что у известных синдромов наблюдается фенотипическая вариабельность, не позволяющая провести достаточно точную дифференциальную диагностику. Обращает на себя внимание незначительная симптоматика, стертая кар-

тина синдромов, затрудняющая постановку клинического диагноза.

Полученные нами в ходе исследования данные, иллюстрирующие структуру генетических нарушений, ассоциированных с расстройствами интеллектуального развития, указывают на то, что заметное место в ней занимают хромосомные микродупликации. Продемонстрированное в нашей работе преобладание патогенетически значимых увеличений копииности ДНК, в отличие от преобладающих исследований аналогичных выборок, регистрирующих дисбаланс по числу клинически значимых CNVs с преобладанием делеций, вероятно, может указывать на недооценку роли сегментных трисомий в развитии патологии и на важность их более детального изучения.

Одним из объяснений проблемы более редкого выявления патогенных дупликаций может являться процесс возникновения реципрокных CNVs: основным генетическим механизмом, обуславливающим генерацию таких нарушений, является внутри- или неаллельная гомологичная рекомбинация. Дупликации принято считать менее патогенными, по сравнению с делециями, возможно, в виду особенностей их клинического проявления, которое является более мягким и варибельным, в результате чего некоторые признаки могут остаться незамеченными врачом. Кроме того, гено-фенотипические корреляции при дупликациях не столь однозначны, как таковые при делециях: известно, что делеции приводят к гаплонедостаточности, а дупликации в зави-

симости от точек разрыва гена могут быть как нейтральными, так и приводить к реализации патологического фенотипа через усиление функции или снижение/потерю функции гена. При этом, точки разрывов при хромосомной перестройке могут нарушать кодирующую последовательность гена, а также способны приводить к появлению новых химерных генов посредством слияния двух других.

Подтверждающая диагностика была проведена для 17 хромосомных микродупликаций. В 13 случаях частичные трисомии оказались уникальными, и лишь для двух регионов (12p13.31, 12q24.12) зарегистрировано по две аналогичные микродупликации. Один пациент явился носителем впервые выявленной трипликации 4q21.21-q21.22 (таблица).

Клиническая значимость частичных трисомий, не зарегистрированных в базах доброкачественных вариантов, определялась посредством анализа генетических характеристик идентифицированных перестроек: размера, происхождения, количества и функций генов внутри aberrации. При распределении по размеру обнаруженных нами в ходе исследования микродупликаций показано преобладание верифицированных aberrаций протяженностью до 1 млн п.н. (10 микродупликаций, что составляет 59% от их общего числа 17). Поскольку размер aberrации и связанное с ним количество вовлеченных генов, как правило, ассоциирован с тяжестью клинических проявлений, следует предполагать, что относительно высокая встречаемость микроструктурных пе-

Таблица

Подтвержденные потенциально патогенные CNVs у пациентов с идиопатической умственной отсталостью

Пациент	Результаты aCGH (ISCN (2013))	Размер, млн п.н.
1	arr[hg18] 1q25.1-q25.2(172269000_178409000)x3 pat	6,14
2	arr[hg18] 2p12 – p11.2 (75923094_83749392)x3 dn	7,82
3	arr[hg18] 2p25.3-p25.2(632724_6052614)x3 dn	5,42
4	arr[hg18] 3p26.3(701645_1467721)x3 pat	0,77
5	arr[hg18] 4q21.21-q21.22(82189943_83801062)x4 dn	1,61
6	arr[hg18] 5q33.1(148620000_148735000)x3 mat	0,11
7	arr[hg18] 6p22.2(25677000_26393000)x3 *	0,71
8	arr[hg18] 7q21.3(94,769_94,901)x3 **	0,132
9	arr[hg18] 7q34(137850612_138121572)x3 dn	0,27
10	arr[hg18] 10q26.3(131662281_134969700)x3 dn	3,31
11	arr[hg18] 12p13.31(7696275_7894740)x3 mat	0,2
12	arr[hg18] 12p13.31(7696275_7894740)x3 mat	0,2
13	arr[hg18] 12q24.12(110668504_110853677)x3 mat	0,19
14	arr[hg18] 12q24.12(110668504_110793312)x3 mat	0,12
15	arr[hg18] 14q11.2(20767632_22722130)x3 dn	1,9
16	arr[hg18] 16q23.1(75761600_77528224)x3 mat	1,76
17	arr[hg18] 20q13.12(42595506_43137505)x3 pat	0,54

Примечание. * — Подтверждена, родители не доступны; ** — не от матери.

рестроек непротяженного размера говорит о низкой вероятности реализации патологического фенотипа. Особое внимание было уделено анализу геномного состава хромосомных перестроек. В области каждой потенциально значимой микродупликации находятся гены, увеличение копий которых может иметь отношение к патогенезу интеллектуальных нарушений.

Определенную сложность при отнесении CNVs к какой-либо клинической категории составила природа их возникновения: *de novo* или унаследованные. Микродупликации часто наследуются от кого-либо из условно здоровых родителей, поэтому считаются не патогенными. Однако, некорректно рассматривать наследование как доказательство отсутствия связи между болезнью и CNV. Вариация числа копий ДНК может являться патогенной, но не проявляться у родителя. Причинами этого могут быть неполная пенетрантность, вариабельная экспрессивность, импринтированность ассоциированных с нарушениями умственного развития локусов, мозаицизм у родителя, при котором CNV может не присутствовать во всех тканях и не проявляться в полной мере, сенсibilизированный генетический фон и дополнительные модифицирующие заболевание генетические особенности у пробанда, отсутствующие у родителя в статусе носителя. В нашем исследовании был проведен анализ происхождения сегментных трисомий, обнаруженных у пробандов, с использованием количественной ПЦР в режиме реального времени с предварительным подбором праймеров. Семейный материал родителей, а в некоторых случаях бабушек и дедушек был доступен для 17 пациентов. В результате, идентифицированные микродупликации в 8 случаях (47%) имели происхождение *de novo*, а в 9 случаях (53%) были унаследованы от фенотипически здоровых родителей; в 33% случаев выявленные изменения были отцовского проис-

хождения, в 67% — материнского. При этом нами показано, что унаследованные микродупликации имеют размер до 1 млн п.н., тогда как для более крупных перестроек характерно происхождение *de novo*.

Очень важным представляется описание фенотипических особенностей пациентов, являющихся носителями клинически значимых хромосомных микродупликаций, что помогает расширить знания об этиологии интеллектуальных расстройств. Клиническая картина у больных с увеличением копийности генов характеризуется значительной вариабельностью степени выраженности проявлений, и включает идентичные, уникальные и зеркальные признаки, по сравнению с фенотипами пациентов, имеющих микроделеции в соответствующих хромосомных регионах. Подробная клинико-генетическая характеристика пациентов с патогенными микродупликациями обеспечивает накопление информации и расширение устоявшихся представлений, что впоследствии может привести к описанию новых синдромов, ассоциированных с интеллектуальными расстройствами.

Список литературы

1. Лавров А. В. и др. Генетика умственной отсталости // Российский вестник перинатологии и педиатрии. — 2016. — Т. 61. — №. 6.
2. Diagnostic and statistical manual of mental disorders // American Psychiatric Association. 4th ed., Rev. Washington, DC: American Psychiatric Association. — 2000.
3. Кашеварова А.А., Лебедев И.Н. Геномная архитектура хромосомных болезней человека // Генетика. 2016. 52. № 5. С.511-528.
4. Протокол aCGH для микрочипов Agilent Technologies — http://www.chem-agilent.com/pdf/G4410-90020v3_1_CGH_ULS_Protocol.pdf