



DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-161-1-145-149

Роль новых молекулярно-генетических технологий в дифференциальной диагностике орфанных болезней у детей

Ларионова В. И.¹, Храмцова Е. Г.^{1,3}, Никитина А. П.², Серебрякова Е. А.⁴, Мельникова И. Ю.^{1,3}

¹ ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург 191015, Россия

² ФГБУ «Научно-исследовательский детский ортопедический институт имени Г. И. Турнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург 196603, Россия

³ ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург 191036, Россия

⁴ РЦ «Центр Биобанк» Санкт-Петербургского Государственного Университета, Санкт-Петербург 198504, Россия

New molecular-genetic technologies in differential diagnostics of orphan diseases in children

V. I. Larionova¹, E. G. Khramtsova^{1,3}, A. P. Nikitina², E. A. Serebryakova⁴, I. Yu. Melnikova^{1,3}

¹ North-West State Medical University. I. I. Mechnikova of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg 191015, Russia

² Children's Research Orthopedic Institute named after G. I. Turner of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg 196603, Russia

³ St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg 191036, Russia

⁴ Biobank Center of St. Petersburg State University, St. Petersburg 198504, Russia

Для цитирования: Ларионова В. И., Храмцова Е. Г., Никитина А. П., Серебрякова Е. А., Мельникова И. Ю. Роль новых молекулярно-генетических технологий в дифференциальной диагностике орфанных болезней у детей. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2019;161(1): 145–149. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-161-1-145-149

For citation: Larionova V. I., Khramtsova E. G., Nikitina A. P., Serebryakova E. A., Melnikova I. Yu. New molecular-genetic technologies in differential diagnostics of orphan diseases in children. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2019;161(1): 145–149. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-161-1-145-149

Ларионова Валентина Ильинична, д.м.н., профессор кафедры педиатрии и детской кардиологии

Храмцова Елена Георгиевна, к.м.н., доцент профессор кафедры педиатрии и детской кардиологии; научный сотрудник

Никитина Анна Петровна, врач-генетик консультативно-диагностического отделения

Серебрякова Елена Андреевна, врач-генетик

Мельникова Ирина Юрьевна, д.м.н., профессор, зав. кафедрой педиатрии и детской кардиологии; старший научный сотрудник, Scopus Author ID: 56732726600

Valentina I. Larionova, Ph.D., professor of the Department of Pediatrics and Pediatric Cardiology

Elena G. Khramtsova, candidate of medical sciences, associate professor, professor of the Department of Pediatrics and pediatric cardiology; Researcher

Anna P. Nikitina, geneticist of the consultative and diagnostic department

Elena A. Serebryakova, geneticist

Irina Yu. Melnikova, Ph.D., professor, head. Department of Pediatrics and Pediatric Cardiology; Senior Researcher, Scopus Author ID: 56732726600

✉ Corresponding author:

Мельникова Ирина Юрьевна

Irina Yu. Melnikova

melnikovai@yandex.ru

Резюме

В статье рассмотрена стратегия диагностического поиска и применения современных методов молекулярной генетики в диагностике наследственными заболеваниями. Представлен подход молекулярно-генетической диагностики с помощью технологии NGS (секвенирование нового поколения). На клиническом примере больного с синдромом

Лойса-Дитца, тип 2 показана значимость для установления диагноза метода таргетного секвенирования участков ДНК, относящихся к кодирующим областям генов, ассоциированных с контрактуральной арахнодактилией, синдромом Марфана и наследственными заболеваниями со схожими фенотипическими проявлениями.

Ключевые слова: дети, наследственные заболевания, дисморфии, синдром Лойса-Дитца, NGS (секвенирование нового поколения)

Summary

The article discusses the diagnostic strategy of search and application of modern methods of molecular genetics in the diagnosis of hereditary diseases. The approach of molecular genetic diagnosis using NGS technology (new-generation sequencing). At the clinical example of the patient with Loys-Dietz syndrome, type 2 is shown the significance for diagnosis method of target sequencing of DNA sites relating to the coding areas of the genes associated with contractural arachnodactyly, Marfan's syndrome and other hereditary diseases with similar phenotypical manifestations.

Keywords: children, hereditary diseases, dysmorphia, Loys-Dietz syndrome, NGS (next generation sequencing) technology

Диагностика наследственных заболеваний является неотъемлемой частью клинической деятельности врача педиатра, так как суммарно наследственные болезни являются достаточно распространенными и не всегда являются редкими. Стратегия диагностики каждого заболевания основана на знании особенностей его патогенеза. В большинстве случаев клинические, инструментальные, биохимические и молекулярно-генетические методы в диагностическом процессе являются практически всегда взаимодополняющими. Вместе с тем необходимо отметить, что выбор метода молекулярной диагностики основан на комплексной оценке всех диагностических данных и определяется формированием «рабочей» концепции диагноза. Клинические проявления заболевания и оценка семейного анамнеза являются определяющими в формировании диагноза. Особенно важно с клинической точки зрения выявление дисморфий [1,2]. Выполнение молекулярно-генетического анализа и подтверждение диагноза на молекулярном уровне является обязательным этапом диагностики в современной медицине и определяет выбор терапевтических подходов. В качестве подтверждения вышеизложенного приводим следующее клиническое наблюдение.

Клинический пример 1 (синдром Лойса-Дитца, тип 2, ассоциированный с мутацией в гене *TGFBR2*). Пациент – мальчик, 3 года 5 месяцев, с неотягощенным семейным анамнезом, у которого на 32-й неделе гестационного периода определялись УЗ-признаки врожденной косолапости, родился с врожденными деформациями стоп и пальцев кистей, а также с признаками компенсированной гидроцефалии. Масса тела при рождении – 3,5 кг, длина тела – 57 см.

При осмотре черепа выявлена сложная деформация – скафоцефалия и плагиоцефалия, нависающие лобные бугры, правостороннее сращение лямбдовидного шва. При осмотре лица отмечались: гипертелоризм, голубые склеры, короткая спинка и гипоплазия крыльев носа, а также микрогнатия, ретрогения, высокое нёбо, множественный кариес, ушные раковины мягкие. Осмотр офтальмолога выявил гиперметропию. Отмечалась повышенная растяжимость кожи, мышечная гипотония.

Со стороны верхних конечностей отмечалась деформация обеих кистей, пальцы кистей длинные, тонкие, клинодактилия и камптодактилия 2–5 пальцев, сгибательные контрактуры с ульнарной девиацией 3–5 пальцев, приведение первых пальцев, сгибательное положение пястно-фаланговых суставов 2–5 пальцев обеих кистей. Размеры костей левой кисти несколько уменьшены, оксификация костей запястья соответствует 3 годам. Со стороны нижних конечностей отмечались: genu valgum, рекурвация в коленных суставах, сложная (многоплоскостная) варусная деформация обоих стоп, умеренное укорочение первой плюсневой кости, гипермобильность суставов. Со стороны позвоночника: укорочение шеи, сколиотическое нарушение осанки, деформация грудины с килевидной деформацией грудной клетки, физиологические изгибы позвоночника в сагиттальной плоскости резко выпрямлены, Spina bifida posterior displastica S1-S2, деформация апофизарных углов тел позвонков, вертикальная ориентация крестца, перекос таза вправо.

Из анамнеза известно, что ребенок с рождения наблюдается неврологом с диагнозом компенсированная гидроцефалия, отмечается задержка моторного развития. Эхокардиография позволила выявить открытое овальное окно без гемодинамических нарушений.

На основании анализа клинических проявлений было высказано предположение о наличии у ребенка какого-либо из синдромов, ассоциированных с контрактуральной арахнодактилией, в частности о наличии у ребенка синдрома Лойса-Дитца [3, 4]. Данное заболевание имеет аутосомно-доминантное наследование и характеризуется клинической гетерогенностью. Клиническая картина данного синдрома включает системное поражение соединительной ткани, орбитальный гипертелоризм, расщелина нёба и/или uvula, аортальные и артериальные аневризмы, дополнительные клинические проявления варьируют [5, 6]. У пациента было проведено молекулярно-генетическое исследование методом таргетного секвенирования участков ДНК, относящихся к кодирующим областям генов, ассоциированных с контрактуральной арахнодактилией, синдромом Марфана и другими

наследственными заболеваниями со схожими фенотипическими проявлениями [7, 8]. На сегодняшний день этот метод представлен несколькими диагностическими подходами. Одним из подходов молекулярно-генетической диагностики с помощью технологии NGS являются так называемые таргетные панели, в которые включены гены для отдельной нозологии [9, 10, 11].

Результат исследования показал, что у ребенка обнаружена ранее не описанная гетерозиготная мутация в 6 экзоне гена *TGFBR2* (chr3:30715721G>C),

приводящая к замене аминокислоты в 485 позиции белка (ARG485PRO, NM_001024847.2). Гетерозиготные мутации в гене *TGFBR2* описаны у пациентов с синдромом Лойса-Дитца типа 2. Найденная мутация не зарегистрирована в контрольных выборках «1000 геномов», ESP6500 и ExAC. Алгоритмы предсказания патогенности расценивают данную мутацию как вероятно патогенную (SIFT: 0.000, Polyphen2_HDIV: 1.000, Polyphen2_HVAR: 0.000, MutationTaster: 1.000, PROVEAN: -6.820, LRT: D).

Заключение

Учитывая данные анамнеза и характерные клинические проявления заболевания у пациента, а также сделанное заключение о патогенности обнаруженной у пациента генной мутации в 6 экзоне гена *TGFBR2* (chr3:30715721G>C) ассоциированного с синдромом Лойса-Дитца, тип 2, позволили подтвердить диагноз и определить тип наследования заболевания как аутосомно-доминантный. Отсутствие среди родственников пробанда аналогичной клинической картины, свидетельствует о формировании обнаруженной мутации *de novo*.

За последнее время секвенирование нового поколения стало неотъемлемым компонентом диагностики наследственных заболеваний, позволяющее «прочитать» большое количество последовательностей ДНК за относительно быстрый период времени. Очевидно, что с появлением новых технологий возникла сложная задача перед лабораторией – расшифровка большого массива информации, которая позволяет идентифицировать значимые изменения, приводящие к развитию наследственного заболевания [12, 13]. Наряду с этим изменилась структура самой лаборатории. Теперь важную роль в интерпретации полученной информации играют не только сотрудники лаборатории, но и биоинформатики, а также врачи-генетики и врачи других специальностей, силы которых задействованы на определенных этапах анализа данных. Врач – педиатр, как и врач любой специальности, направляющий пациента на секвенирование нового поколения, должен максимально полно отразить данные о клиническом статусе пациента, семейном анамнезе, его этнической принадлежности, результаты инструментального и лабораторного обследования.

Перед направлением на NGS следует убедиться в том, что альтернативные методы молекулярно-генетической диагностики данного наследственного заболевания отсутствуют, и этот метод действительно подойдет в конкретном случае. Пациенту в доступной форме должна быть предоставлена исчерпывающая информация о методе секвенирования нового поколения. Следует заранее предупредить, что причинный генетический вариант может быть не обнаружен из-за ограничения метода. В этом случае будет необходим поиск причины развития заболевания другим методом. Или следует расширить список генов для секвенирования. Следует помнить о том, что в результате NGS могут быть выявлены вариан-

ты с неопределенной клинической значимостью [14, 15]. До наступления эры NGS было принято все изменения в генах разделять на полиморфизмы и мутации. Однако, согласно разработанным рекомендациям ACMG (Американский колледж медицинской генетики и геномики, 2015), было предложено использовать термин «вариант» со следующими модификаторами: патогенный, вероятно патогенный, неопределенного значения, вероятно доброкачественный, доброкачественный [14]. В случае выявления у пациента варианта с неопределенной клинической значимостью, результаты секвенирования и значимость выявленных вариантов для диагностики конкретного заболевания может быть пересмотрена (переоценена) в связи с обновлением научной информации (установлена связь заболевания с изменениями в других генах, новая информация в характеристике гена(-ов) и/или заболевания и т.д.).

При необходимости можно воспользоваться полноэкзомным секвенированием (WES). Впрочем, данный метод наиболее эффективен в научных исследованиях больших выборок или в случае отсутствия «рабочей» концепции диагноза [16]. При секвенировании нового поколения могут возникать ошибки при самом прочитывании последовательности, что в свою очередь может привести к неточному анализу и неправильному диагнозу, поэтому результат NGS необходимо перепроверять альтернативным методом. Например, с помощью секвенирования по Сенгеру или ПЦР-ПДРФ анализ. Об этом следует предупреждать пациентов еще на первичной консультации. Многие ошибки, связанные с секвенированием нового поколения, могут быть смягчены с помощью использования эталонных стандартов, которые рекомендованы международными организациями. Исключительно важен преаналитический этап, нарушения в котором могут повлиять на результат секвенирования. Ошибки, осуществляемые на этом этапе, могут привести к нежелательным последствиям (например, ошибка идентификации биологического образца, в следствие неправильного хранения образца низкое качество ДНК и тд). Поэтому все этапы должны проходить согласно стандартным операционным процедурам (СОП), которые позволяют правильно осуществлять забор крови, ее транспортировку и хранение. В заключении, полученном из лаборатории по результатам секвенирования, должна содержаться следующая информация:

1. Сведения о пациенте (фамилия, имя, отчество, дата рождения, пол, причина направления).
 2. Сведения об образце (тип материала, дата забора материала).
 3. Результат исследования: название гена (например, *NF1*); хромосома на которой расположен ген (например, Chr17); координата выявленного варианта (например, 29556079); нуклеотидная замена в цепи ДНК (например, с.2446С>Т, которая означает, что произошла замена нуклеотида С на Т в 2446 положении); аминокислотная замена (например, р. R816X – это означает, что R-аминокислота аргинин в 816 положении заменилась на стоп-кодон, который обозначается буквой X или может обозначаться символом – *); rs – идентификационный номер выявленного варианта (или он может отсутствовать если вариант очень редкий и еще не зарегистрирован в базах данных); зиготность варианта (выявленный вариант в гетерозиготном или гомозиготном состоянии); частота встречаемости выявленного аллеля в популяционных базах данных (например, 1000 Genomes, ExAC, ESP6500); результат предсказания патогенности выявленного варианта с помощью компьютерных программ, так называемых предикторов (SIFT, PolyPhen2, PAPI, PROVEAN, MutationTaster).
 4. Интерпретация результатов исследования, где указывается информация о гене и заболеваниях, ассоциированных с изменениями в этом гене, информация о выявленном варианте, упоминания о литературных источниках, в которых есть описание фенотипа при выявленном варианте, а также может присутствовать оценка патогенности варианта по совокупности полученных данных).
 5. Описание технологии секвенирования, ограничения метода, примечания.
- В заключение важно отметить, что в случае выявления наследственного заболевания у ребенка, даже имеющего молекулярно-генетическое подтверждение, врач-педиатр должен направить семью к врачу генетику для осуществления полноценной медико-генетической консультации.

Литература | References

1. Асанов А.Ю., Демикова Н.С., Голимбет В.Е. Основы генетики. М.: Академия, 2012.
Asanov A. Yu., Demikova N. S., Golimbet V. E. Basics of genetics. Moscow, Academy Publ., 2012.
2. Ларионова В.И., Храмова Е.Г., Никитина А.П., Булатникова М.А., Костик М.М., Мельникова И.Ю., Виссарионов С.В. Диагностика и лечение наследственных заболеваний обмена с поражением скелета в практике ортопеда и педиатра: пособие для врачей. МЗ РФ ФГБУ «НИДОИ им. Г.И. Турнера», МЗ РФ ФГБОУ ВО «СЗГМУ им. И.И. Мечникова», ФГБОУ «СПбГПМУ» МЗ РФ. СПб.: ООО «СПб СРП «Павел» ВОГ», 2017.
Larionova V. I., Khramtsova E. G., Nikitina A. P., Bulatnikova M. A., Kostik M. M., Melnikova I. Yu., Vissarionov S. V. Diagnosis and treatment of hereditary metabolic diseases with skeletal lesions in the practice of an orthopedist and pediatrician: a manual for doctors. SPb. LLC SPB-SRP "Pavel" VOG. Publ. 2017.
3. Seo Go Hum, Kim Yoon-Myung, Kang Eungu, Kim Gu-Hwan, Seo Eul-Ju, Beom Hee Lee, Choi Jin-Ho, Yoo Han-Wook. The phenotypic heterogeneity of patients with Marfan-related disorders and their variant spectrums. *Medicine Baltimore*. 2018; 97(20): 107–67.
4. Lerner-Ellis J.P., Aldubayan S.H., Hernandez A.L., Kelly M.A., Stuenkel A.J., Walsh J., Joshi V.A. The spectrum of FBN1, TGFbetaR1, TGFbetaR2 and ACTA2 variants in 594 individuals with suspected Marfan syndrome, Loeys-Dietz syndrome or Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections (TAAD). *Mol Genet Metab*. 2014; 112(2):171–6.
5. van de Laar I. M., Oldenburg R. A., Pals G., Roos-Hesselink J.W., de Graaf B. M., Verhagen J. M., Hoedemaekers Y. M., Willemsen R., Severijnen L. A., Venselaar H., Vriend G., Pattynama P. M., Collee M., Majoor-Krakauer D., Poldermans D., Frohn-Mulder I.M., Micha D., Timmermans J., Hilhorst-Hofstee Y., Bierma-zeinstra S.M., Willems P. J., Kros J. M., Oei E. H., Oostra B. A., Wessels M. W., Bertoli-Avella A. M. Mutations in SMAD3 cause a syndromic form of aortic aneurysms and dissections with early-onset osteoarthritis. *Nature genetics*. 2011; 43 (2): 121–6.
6. Loeys B. L., Schwarze U., Holm T., Callewaert B. L., Thomas G. H., Pannu H., De Backer J. F., Oswald G. L., Symoens S., Manouvrier S., Roberts A. E., Faravelli F., Greco M. A., Pyeritz R. E., Milewicz D. M., Couke P. J., Cameron D. E., Braverman A. C., Byers P. H., De Paepe A. M., Dietz H. C. Aneurysm syndromes caused by mutations in the TGF-beta receptor. *N Engl J Med*. 2006; 355(8): 788–98.
7. Attias D., Stheneur C., Roy C., Collod-Beroud G., De-taint D., Faivre L., Delrue M. A., Cohen L., Francannet C., Beroud C., Claustres M., Iserin F., Khau Van Kien P., Lacombe D., Le Merrer M., Lyonnet S., Odent S., Plauchu H., Rio M., Rossi A., Sidi D., Steg P. G., Ravaud P., Boileau C., Jondeau G. Comparison of clinical presentations and outcomes between patients with TGFBR2 and FBN1 mutations in Marfan syndrome and related disorders. *Circulation*. 2009; 120(25): 2541–2549.
8. MacCarrick Gretchen, Black III James H., Bowdin Sarah, El-Hamamsy Ismail, Frischmeyer-Guerrero Pamela A., Guerrero Anthony L., Sponseller Paul D., Loyes Bart, Dietz III Harry C. Loeys-Dietz syndrom a primer for diagnosis and management. *Genetics in Medicine*. 2014; 16: 576–587.
9. Hardwick Simon A., Deveson Ira W., Mercer Tim R. Reference standards for next-generation sequencing. *Nat Rev Genet*. 2017; 18(8): 473–484.
10. Raffan E., Semple R. K. Next generation sequencing – implications for clinical practice. *British Medical Bulletin*. 2011; 99: 53–71.
11. de Koning T. J., Jongbloed J. D., Sikkema-Raddatz B., Sinke R. J. Targeted next-generation sequencing panels for monogenetic disorders in clinical diagnostics: the opportunities and challenges. *Expert Rev Mol Diagn*. 2015; 15(1): 61–70.
12. Shashi V., McConkie-Rosell A., Rosell B., Shock K., Vellore K., McDonald M., Jiang Y. H., Xie P., Need A., Goldstein D. B. The utility of the traditional medical genetics diagnostic evaluation in the context of next-generation sequencing for undiagnosed genetic disorders. *Genet Med*. 2014; 16(2): 176–82.

13. *Di Resta Chiara, Galbiati Silvia, Carrera Paola, Ferrari Maurizio.* Next-generation sequencing approach for the diagnosis of human diseases: open challenges and new opportunities *Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.* 2018; 29(1): 4–14.
14. *Richards Sue, Aziz Nazneen, Bale Sherri, Bick David, Das Soma, Gastier-Foster Julie, Grody Wayne W., Hegde Madhuri, Lyon Elaine, Elaine Spector Elaine, Voelkerding Karl, Rehm Heidi L.* 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.
15. *Santani Avni, Murrell Jill, Funke Birgit, Yu Zhenming, Hegde Madhuri, Mao Rong, Ferreira-Gonzalez Andrea, Voelkerding Karl V., Weck K. E.* Development and validation of targeted next-generation sequencing panels for detection of germline variants in inherited diseases. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine.* 2017; 141(6): 787–797.
16. *Суспицын Е. Н., Тюрин В. И., Имянитов Е. Н., Соколенко А. П.* Полноэкзомное секвенирование: принципы и диагностические возможности. *Педиатр. Санкт-Петербург.* 2016; 7(4): 142–146.

Suspitsin E. N., Tyurin V. I., Imyaninov E. N., Sokolenko A. P. Whole exome sequencing: principles and diagnostic capabilities, *Russian Journal of Pediatrician (St Petersburg),* 2016;7(4):142–146 doi.org/10.17816/PED74142–146