

Полногеномное секвенирование у детей с эпилепсией и нарушениями развития

Е.Д. Белоусова¹, О.С. Грознова^{1–3}, В.Ю. Воинова¹

¹ОСП «Научно-исследовательский клинический институт педиатрии и детской хирургии им. академика Ю.Е. Вельтищева» (Институт Вельтищева) ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия;

²ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Россия;

³Благотворительный фонд медико-социальных генетических проектов помощи «Геном жизни», Москва, Россия

Genome-wide sequencing in children with epilepsy and developmental disorders

E.D. Belousova¹, O.S. Groznova^{1–3}, V.Yu. Voinova¹

¹Veltischev Research and Clinical Institute for Pediatrics and Pediatric Surgery of the Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia;

²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia;

³Charity foundation for medical and social genetic aid projects "Life Genome," Moscow, Russia

Прогресс генетических методов диагностики и значительное улучшение качества секвенирования нового поколения (NGS) привели к революции в изучении генетики эпилепсии. Полногеномное секвенирование является «золотым стандартом» в генетических исследованиях при эпилепсии.

Материал и методы. Полногеномное секвенирование выполнено у 168 пробандов в возрасте от 1 мес до 18 лет с предполагаемым диагнозом генетической эпилепсии. Полногеномное секвенирование назначалось пациентам, у которых, наряду с эпилепсией, отмечались задержка психоречевого развития и/или двигательные нарушения и расстройства поведения.

Результаты. По результатам полногеномного секвенирования генетические варианты, имеющие отношение к фенотипу заболевания, выявлены у 137 (81,5%) из 168 детей, вариации числа копий ДНК отмечались у 14 (8,3%) из 168 больных. Варианты с неясным клиническим значением описаны у 35 (25,54%) из 137 пациентов с выявленными генетическими вариантами, имеющими отношение к фенотипу. У остальных 102 (74,45%) из 137 больных выявленные каузативные генетические варианты описывались как вероятно патогенные и патогенные. У 37 (27%) из 137 больных выявлены моногенные энцефалопатии развития и эпилептические, при этом их спектр был чрезвычайно широким (от 1-го до 97-го типа). У 52 (37,9%) из 137 детей подтверждено наличие конкретного генетического синдрома вне рамок энцефалопатии развития и эпилептической, классифицированных в OMIM.

Заключение. Результаты подтверждают высокую информативность полногеномного секвенирования в группе детей с сочетанием эпилепсии, интеллектуальных, двигательных и поведенческих расстройств. В большинстве случаев результаты позволяют либо назначить генотип-ориентированное симптоматическое (реже — патогенетическое) лечение, либо рационально обосновать тактику дальнейшего наблюдения и обследования, а также повысить эффективность медико-генетического консультирования. Авторы выражают искреннюю благодарность Благотворительному фонду медико-социальных генетических проектов помощи «Геном жизни» за содействие в проведении полногеномного секвенирования большинства описываемых больных.

Ключевые слова: дети, эпилепсия, нарушения развития, полногеномное секвенирование, энцефалопатии развития и эпилептические.

Для цитирования: Белоусова Е.Д., Грознова О.С., Воинова В.Ю. Полногеномное секвенирование у с эпилепсией и нарушениями развития. Рос вестн перинатол и педиатр 2024; 69:(2): 56–64. DOI: 10.21508/1027-4065-2024-69-2-56-64

The progress of genetic diagnostic methods and a significant improvement in the quality of next-generation sequencing (NGS) have led to a revolution in the study of the genetics of epilepsy. Genome-wide sequencing (PSG) is the «gold standard» in genetic research in epilepsy.

Material and methods. Genome-wide sequencing was performed in 168 probands aged from 1 month to 18 years with a suspected diagnosis of genetic epilepsy. PSG was prescribed to patients who, alongside with epilepsy, had delayed intellectual/speech development and/or motor disorders and behavioral disorders.

Results. According to the results of PSG, genetic variants related to the phenotype of the disease were detected in 137 out of 168 (81.5%) children, variations in the number of DNA copies were noted in 14 out of 168 (8.3%) patients. Variants with unclear clinical significance were described in 35 of 137 (25.54%). In the remaining 102 out of 137 (74.45%) patients, the identified causative genetic variants were described as probably pathogenic and pathogenic. Monogenic developmental and epileptic encephalopathies (DEE) were detected in 37/137 or 27% of all patients, while the spectrum of these genetic encephalopathies was extremely wide (from DEE type 1 to DEE type 97). In 52/137 (37.9%) children, the presence of a specific genetic syndrome outside the framework of the DEE, classified in OMIM, was confirmed.

Conclusion. The results confirm the high informative value of genome-wide sequencing in a group of children with a combination of epilepsy, intellectual, speech, motor and behavioral disorders. In most cases, the results allow either to prescribe a genotype-oriented symptomatic (less often pathogenetic) treatment, or rationally justify the tactics of further observation and examination, as well as to increase the effectiveness of medical and genetic counseling. The authors express their sincere gratitude to the Charity foundation for medical and social genetic aid projects «Life Genome» for assistance in conducting genome-wide sequencing of most of the described patients.

Key words: children, epilepsy, developmental disorders, genome-wide sequencing, developmental and epileptic encephalopathies.

For citation: Belousova E.D., Groznova O.S., Voinova V.Yu. Genome-wide sequencing in children with epilepsy and developmental disorders. Ros Vestn Perinatol i Peditr 2024; 69:(2): 56–64 (in Russ). DOI: 10.21508/1027-4065-2024-69-2-56-64

Эпилепсия — тяжелое, часто инвалидизирующее состояние, в этиологии которого значительную роль играют генетические факторы. Предполагается, что генетические факторы играют определенную роль у 70–80% пациентов с эпилепсией [1]. Наиболее часто встречающиеся эпилепсии (распространенность которых составляет 3,5–9,8 случая на 1000 населения) имеют сложный (мультифакторный или полигенный) тип наследования, при них крайне трудно установить комплекс генетических вариантов, приводящих к эпилепсии за исключением случаев, когда заболевание носит семейный характер [2]. К эпилепсиям со сложным механизмом наследования относится большая группа генетических генерализованных и фокальных эпилепсий: детская абсансная, юношеская абсансная, юношеская миоклоническая, эпилепсия с изолированными тонико-клоническими приступами, возрастзависимая эпилепсия с центрально-темпоральными спайками и др. 1–2% эпилепсий: либо представляют собой моногенные заболевания, либо являются следствием хромосомных перестроек [3]. Значительная часть моногенных эпилепсий и эпилепсий, связанных с вариациями копий ДНК, имеют ранее начало эпилептических приступов (в первые годы жизни ребенка), сопровождаются регрессом или задержкой психомоторного развития, эпилепсия при них носит фармакорезистентный характер. Эта разнородная по этиологии группа заболеваний получила общее название «энцефалопатии развития и эпилептические». В англоязычной литературе они называются *Developmental and Epileptic Encephalopathy (DDE)*; именно так они описываются в OMIM под номерами (номера соответствуют порядку их описания). Благодаря совершенствованию методов генетической диагностики произошла революция в описании, определении прогноза и поиске подходов в терапии именно в этой группе эпилепсий. В настоящее время в OMIM описывается более 110 моногенных энцефалопатий развития и эпилептических, каждая из которых по сути — отдельное заболевание [4].

© Коллектив авторов, 2024

Адрес для корреспонденции: Белоусова Елена Дмитриевна — д.м.н., проф., заслуженный врач РФ, зав. отделом психоневрологии и эпилептологии Научно-исследовательского клинического института педиатрии и детской хирургии им. академика Ю.Е. Вельтищева, ORCID: 0000–003–3594–6974 e-mail: edbelous56@gmail.com

Грознова Ольга Сергеевна — д.м.н., гл. науч. сотр. отдела детской кардиологии и аритмологии Научно-исследовательского клинического института педиатрии и детской хирургии им. академика Ю.Е. Вельтищева; проф. кафедры инновационной педиатрии и детской хирургии Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова; дир. Благотворительного фонда медико-социальных генетических проектов помощи «Геном жизни», ORCID: 0000–0002–7511–3240

117997 Москва, ул. Островитянова, д. 1

Воинова Виктория Юрьевна — д.м.н., зав. отделом клинической генетики Научно-исследовательского клинического института педиатрии и детской хирургии им. академика Ю.Е. Вельтищева, ORCID: 0000–0001–8491–0228 125412 Москва, ул. Талдомская, д. 2

Генетическое обследование пациента с эпилепсией неизвестной (неустановленной) этиологии в настоящее время стало частью ежедневной клинической практики. Его результаты напрямую влияют на диагноз, прогноз и совокупность медицинских мероприятий у пациента. Клиническое сходство разных генетических энцефалопатий развития и эпилептических затрудняет их таргетную диагностику, поэтому используются более информативные методы (диагностические панели генов и секвенирование экзона). Однако, безусловно, предпочтение всегда отдается полногеномному секвенированию — самому информативному методу, который позволяет определять интронные генетические варианты, а также структурные варианты/вариации числа копий ДНК и варианты в митохондриальной ДНК. Ограничением к применению полногеномного секвенирования служат трудоемкость самого исследования, а также его высокая стоимость.

Алгоритм выбора генетического исследования определяется несколькими факторами, в том числе стоимостью исследования. Если исследование оплачивает малообеспеченная семья ребенка самостоятельно, при возможности лучше начать с проведения генетических панелей в сочетании с хромосомным микроматричным анализом, а затем переходить к полноэкзомному и полногеномному секвенированию. Однако подобный подход, минимизируя стоимость исследования, нередко очень значительно увеличивает сроки до постановки диагноза, а значит, и время до начала генотип-ориентированной терапии. Если генетические исследования оплачивает благотворительная организация, следует определить показания к проведению полногеномного исследования в качестве «первой линии». В тех случаях, когда предполагается, что причиной заболевания может быть структурный генетический вариант (при наличии, помимо эпилепсии, множественных микроаномалий или пороков развития); если имеется фенотипическая вариабельность в рамках одной семьи; если предполагается наличие двух наследственных заболеваний у одного больного; если результаты ранее проведенных генетических исследований не выявили каузативный вариант или выявленный вариант неполностью соответствует имеющейся клинической картине заболевания; если подозревается аутосомно-рецессивное заболевание как причина эпилепсии, но при проведении других генетических исследований найден каузативный вариант гена только в одном аллеле; если предполагается мутация в митохондриальной ДНК, рекомендуется рассмотреть вопрос о назначении полногеномного секвенирования.

Цель исследования: уточнение генетической этиологии эпилепсии для определения прогноза течения и генотип-ориентированной коррекции терапии.

Характеристика детей и методы исследования

Исследование проводилось на базе нескольких отделений НИКИ педиатрии и детской хирургии: дет-

ского отделения психоневрологии и эпилептологии №1, педиатрического отделения врожденных и наследственных заболеваний и детского научно-практического центра нарушений ритма сердца (в исследование были включены отдельные пациенты с нарушениями ритма сердца в сочетании с эпилепсией).

В исследование включали детей с эпилепсией неустановленной этиологии. Предпочтение в отборе отдавали пациентам, у которых эпилептические приступы сочетались с интеллектуальной недостаточностью, речевыми нарушениями, расстройствами аутистического спектра и двигательными нарушениями (дистония, спастичность, дискинезия). Из исследования исключали больных с ранее установленной этиологией эпилепсии — структурной, аутоиммунной, инфекционной и метаболической. Пороки развития головного мозга, несмотря на структурный характер поражения, также рассматривались как показание к проведению генетического обследования.

Образцы цельной крови брали в пробирки с ЭДТА с соблюдением температурного режима транспортировки (4 °C). Выделение ДНК осуществляли с помощью колоночных наборов. Приготовление ферментативно фрагментированных библиотек проводили в соответствии с протоколом компании-производителя с помощью станции пробоподготовки или ручным способом.

Полногеномное исследование выполняли методом высокопроизводительного секвенирования (NGS) на платформах DNBSEQ-G400, BGISEQ-500 и T7 с использованием наборов для парноконцевого чтения в соответствии с протоколами производителя. Средняя глубина прочтения генома в данном исследовании составила не менее 30×. Число прочтений с качеством Q20 составило не менее 90% от числа прочтений, полученных в результате секвенирования. Число прочтений с качеством Q30 — не менее 80% от числа прочтений, полученных в результате секвенирования.

Биоинформатическая обработка. Данные полногеномного секвенирования (fastq-файлы), выполненного по технологии PCR-free, проанализированы с помощью автоматизированного алгоритма, включающего удаление адаптеров и последовательностей с низким качеством; выравнивание прочтений на версию hg38 генома человека; сортировку прочтений по координате; фильтрацию оптических и ПЦР дубликатов; обнаружение однонуклеотидных генетических вариантов и коротких инсерций и делеций и их фильтрацию согласно качеству; контроль качества секвенирования; обнаружение структурных генетических вариантов двумя ортогональными методами; оценку числа коротких tandemных повторов в клинически значимых локусах и аннотацию вариантов согласно базам данных с клинической информацией.

При поиске клинически значимых генетических вариантов были отфильтрованы варианты с максимальной распространенностью в популяциях более 5%.

Во всех аннотированных генах человека каждый из вариантов проанализирован для выявления влияния на структуру и функцию белка, эволюционную консервативность позиции; влияния на сплайсинг, клинический статус, распространенность и тип наследования соответствующего гена и классифицирован в одну из 5 категорий (патогенные варианты, вероятно патогенные варианты, варианты неопределенного значения, вероятно безвредные варианты, безвредные варианты) в соответствии с рекомендациями ACMG. Варианты из категорий «патогенные», «вероятно патогенные» и «неопределенного значения», имеющие отношение к клинической картине, вынесены в заключение.

Результаты

Полное секвенирование генома проведено 168 пробандам в возрасте от 1 мес до 18 лет (90 лиц женского пола, 78 мужского пола) с предварительным диагнозом, в котором обязательной составляющей было наличие эпилепсии. Наиболее частым диагнозом направления на генетическое обследование был диагноз неклассифицированного предположительно генетического неврологического заболевания с эпилепсией, реже отмечались диагнозы сочетания эпилепсии с интеллектуальными нарушениями или задержкой психомоторного развития. Дети также направлялись на тестирование с множественными пороками развития и эпилепсией, с конкретными пороками развития головного мозга и с отдельными эпилептическими синдромами (синдромы Веста, Отахара, Драве).

Практически все больные до проведения полногеномного секвенирования проходили своеобразную диагностическую «одиссею», иногда довольно длительную. Из-за того, что эпилепсия была нечувствительна к противосудорожным препаратам, детям проводились повторные магнитно-резонансные томографии головного мозга (часто по эпилептическому протоколу), длительные повторные видеоэлектроэнцефалографические мониторинги, таргетная генетическая диагностика и т.д. В большинстве случаев у одного и того же больного было несколько различных биохимических и генетических обследований. Данные по предварительному обследованию до полногеномного секвенирования были представлены в выписке у 86 (51,2%) из 168 пациентов (табл. 1)

По результатам полногеномного секвенирования различные генетические варианты, имеющие отношение к фенотипу, выявлены у 137 (81,5%) из 168 больных. Варианты с неясным клиническим значением выявлены у 35 (25,54%) из 137 пациентов, у остальных 102 (74,45%) из 137 больных они описаны как вероятно патогенные и патогенные каузативные варианты. Генетические варианты были представлены у 3 больных интронными мутациями, у 14 (8,3%) из 168 больных — вариациями числа копий ДНК.

Таблица 1. Число больных, которым были проведены генетические исследования до полногеномного секвенирования ($n=86$)
 Table 1. The number of patients who underwent genetic studies prior to genome-wide sequencing ($n=86$)

Исследование	Число пациентов	
	абс.	%
Кариотипирование	48	55,8
Биохимическое исследование (аминокислотный спектр, определение в моче органических кислот)	37	43,02
Хромосомный микроматричный анализ	12	13,9
Генетические панели (наследственные эпилепсии, большая неврологическая панель, нейродегенеративные заболевания)	7	8,1
Клиническое секвенирование экзона	5	5,8
Полное секвенирование экзона	9	10,5
Таргетная генетическая диагностика (синдром Мартина—Белл, частые мутации митохондриальной ДНК, мутация в гене <i>POLG</i> и т.д.)	20	23,3

Превалировал аутосомно-доминантный тип наследования заболеваний (100/137), реже встречались аутосомно-рецессивный ($n=14$) и X-сцепленный ($n=13$) типы наследования. Отмечались также заболевания с сочетанием возможных различных типов наследования. У 4 пациентов выявленные генетические варианты свидетельствовали о наличии предрасположенности к некоторым генетическим эпилепсиям, т.е. они не были непосредственной причиной заболевания, а скорее свидетельствовали о мультифакторном (сложном) механизме наследования эпилепсии (идиопатической генерализованной и в одном случае семейной височной).

Для невролога наибольший интерес представляла группа моногенных энцефалопатий развития и эпилептических (37/137, или 27% всех пациентов с генетически подтвержденным диагнозом); при этом спектр этих генетических энцефалопатий был чрезвычайно широким (от энцефалопатий развития и эпилептических 1-го типа до энцефалопатий развития и эпилептических 97-го типа). С точки зрения механизма развития энцефалопатий развития и эпилептических лидировали каналопатии: мутации натриевых каналов выявлены у 12 детей (гены *SCN1A*, *SCN8A*, *SCN5A*), мутации калиевых каналов — у 8 (*KCNT2*, *KCNQ2*, *KCNQ5*). Отдельно выделялись синдром Драве ($n=5$) и генетическая эпилепсия/фебрильные судороги плюс ($n=2$). Достаточно сложно описать клиническую картину разных энцефалопатий развития и эпилептических в каждом диагностированном случае, но мы можем привести данные по тем четырем типам энцефалопатий развития и эпилептических, которые встречались минимум у 2 обследованных пациентов (табл. 2). Даже из такого короткого описания небольшой части энцефалопатий развития и эпилептических очевидно, насколько тяжело протекают эти заболевания и какой стойкий оставляют неврологический дефицит в числе в случае, если эпилепсия перестает протекать катастрофически.

У 52 (37,9%) из 137 детей подтверждено наличие конкретного генетического синдрома вне рамок энцефалопатий развития и эпилептических, классифицированных в OMIM. Это достаточно большая группа интеллектуальных расстройств развития (Intellectual Development Disorders) различных типов (13, 42, 61, 64-й и др.), которые в данном случае сопровождались эпилепсией, хорошо известные синдромы Ангельмана, Ретта и Прадера—Вилли, а также большое число более редких генетических эпонимных синдромов: Шаафа—Янг, Вервери—Бради, Коффина—Сириса, CIMDAG, Фелан—Мак-Дермид, Кулен де Фриз, Малан, Лианг—Уонга и др. Ниже мы приводим описание случая синдрома Кулена—де Фриза, который был выявлен в ходе данного исследования.

Пациент С.М., 5 лет; родители с ребенком в возрасте 3 лет впервые обратились в отдел психоневрологии и эпилептологии НИКИ педиатрии и детской хирургии с жалобами на эпилептические приступы у мальчика.

Из анамнеза жизни известно, что ребенок от второй, нормально протекавшей беременности. Семейный анамнез не отягощен по эпилепсии, старший ребенок в семье (девочка) здоров. Роды на сроке 38 нед, плановое кесарево сечение, после рождения у ребенка был синдром угнетения центральной нервной системы и церебральная ишемия II степени, а также внутриутробная гипотрофия I—II степени. Был выявлен врожденный порок сердца: дефекты межпредсердной и межжелудочковой перегородок, межпредсердное сообщение в нижней полой вене. Кроме того, выявлялись пиелозектазия левой почки и двусторонний крипторхизм.

Анамнез заболевания. До начала эпилепсии ребенок развивался с задержкой — позже стал сидеть и ходить (пошел самостоятельно в 1,5 года), отмечались мышечная гипотония и задержка раннего речевого развития, а также черты расстройств аутистического спектра. Первый приступ произошел в возрасте

Таблица 2. Наиболее распространенные в группе обследования энцефалопатии развития и эпилептические (ЭРЭ)
Table 2. The most common developmental and epileptic encephalopathies in the examination group (ER)

ЭРЭ	Номер в OMIM	Ген	Тип наследования	Основные клинические проявления
ЭРЭ97	#619561	CELF2	Аутосомно-доминантный	Задержка развития. Эпилептическая энцефалопатия. Интеллектуальные нарушения. Расстройства аутистического спектра. Мышечная гипотония
ЭРЭ7	#613720	KCNQ2	Аутосомно-доминантный	Эпилептическая энцефалопатия с неонатальным началом (синдром Отахара). Задержка развития. Повреждение базальных ядер по данным магнитно-резонансной томографии головного мозга. Прекращение приступов к/ после 3–4 лет. Стойкий неврологический дефицит
ЭРЭ42	#617106	CACNA1F	Аутосомно-доминантный	Разнообразные типы эпилептических приступов с первых часов и дней жизни. Глобальная задержка развития с тяжелой интеллектуальной недостаточностью. Мышечная гипотония, тремор, атаксия, аномальные движения глаз
ЭРЭ46	#617162	GRIN2D	Аутосомно-доминантный	Начало эпилептических приступов в первые дни жизни. Глобальная задержка развития с трудностями глотания, мышечной гипотонией, гиперрефлексией. Степень интеллектуальных нарушений переменная. Наиболее тяжелое состояние, когда пациенты не имеют развития — не сидят и не говорят

1 года 7 мес в виде потери сознания и симметричного тонического напряжения. Приступы повторялись редко, после более продолжительных аналогичных приступов ребенку был назначен конвулекс в каплях.

В неврологическом статусе при обращении доминировали психоречевая задержка (в 3 года только отдельные слова) и мышечная гипотония. Отмечались высокий и широкий лоб, вытянутое лицо, монголоидный разрез глаз, большие оттопыренные уши. На электроэнцефалограмме регистрировалась фокальная эпилептиформная активность, на магнитно-резонансной томограмме головного мозга — расширение боковых желудочков. Кариотип был нормальным. На основании наличия у ребенка с задержкой развития других пороков развития и микроаномалий предположена генетическая фокальная эпилепсия и назначен хромосомный микроматричный анализ. Данное исследование не было проведено из-за его высокой стоимости. У ребенка после изменения формы вальпроевой кислоты (переведен на депакин хроносфера) приступы отсутствовали в течение 1,5 года, но в апреле 2022 г. развился эпилептический статус, который начался с клоний в руках, больше в правой, которые продолжались 20 мин, без сознания ребенок был несколько часов. В терапию был добавлен второй препарат (раствор леветирацетама), и ребенок был направлен на полногеномное секвенирование за счет фонда «Геном жизни»

В результате исследования получены данные в пользу наличия гетерозиготной делеции с прибли-

зительными границами chr17:45624200–46135420 пар оснований (511 Кб) на длинном плече хромосомы 17 (17q21.3). Делеция затрагивает гены *MART1* и *KANSL1*. По совокупности сведений выявленный вариант расценивается как патогенный. Он будет проверен хромосомным микроматричным анализом, но уже в настоящее время генетические изменения практически полностью соответствуют клиническим проявлениям синдрома Кулена—де Фриза (табл. 3).

При данном синдроме отсутствует генотип-ориентированная медикаментозная терапия, но установление точного генетического диагноза позволяет наметить тактику дальнейшего обследования и ведения пациента. У данного пациента необходимо динамически исследовать остроту слуха, следить за его ростом и при необходимости вводить гормон роста, наблюдать за возможным развитием скелетных аномалий (сколиоза и кифоза), нутритивным статусом [6]. В то же время нет необходимости в повторных магнитно-резонансных томографиях головного мозга и частых видео-ЭЭГ-мониторингах, которые обычно предпринимаются в попытке установить причину фармакорезистентности эпилепсии. Ребенку показана ранняя и интенсивная речевая реабилитация и т.д. Важно также то, что большинство случаев синдрома, обусловленных делецией 17q21.3, являются спорадическими, и это во многом определяет прогноз деторождения в данной семье [6].

Кроме большой группы эпонимных синдромов и группы энцефалопатий развития и эпилептических, выявлены такие редкие генетические заболевания,

как альтернирующая гемиплегия детская, прогрессирующая миоклонус-эпилепсия, 11-й тип, нейрональный цероидный липофусциноз 6-го типа и др. Подтверждена генетическая природа пороков развития головного мозга — ленточной гетеротопии, лиссэнцефалии (у 3 пациентов), полимикрогирии. Секвенирование генома позволило выявить 2 пациентов с редкими формами семейных фокальных эпилепсий — семейной фокальной эпилепсии с вариабельным фокусом (ген *NPRL2*) и эпилепсию с гиперкинетическими приступами сна (ген *CHRNA2*).

Обсуждение

Прогресс генетических методов диагностики и появление секвенирования нового поколения привели к революции в изучении генетики эпилепсии. С помощью полногеномного секвенирования в больших популяциях пациентов с эпилепсией (17 600 пациентов) наконец подтверждена комплексная генетическая природа так называемых идиопатических (сейчас они называются генетическими) генерализованных и фокальных эпилепсий, которые начинаются в детстве и юношеском возрасте [2]. Прогресс также был достигнут в диагностике наиболее тяжелых инвалидизирующих эпилепсий детства, сцепленных со стойкими интеллектуальными, двигательными и поведенческими расстройствами, — генетических энцефалопатий развития и эпилептических. Энцефалопатии развития и эпилептические описываются как гетерогенная группа возрастзависимых эпилепсий, характеризующихся прогрессирующим ухудшением («регресс» развития) или статичной задержкой («плато» развития) психического, моторного и речевого развития, причиной которых служат как сама этиология заболевания, так и очевидная приступная или межприступная эпилептиформная активность на электроэнцефалограмме, с дебютом симптоматики в раннем детском возрасте [7]. Энцефалопатии развития и эпилептические могут возникать в любом возрасте, но чаще всего встречаются у младенцев и детей раннего возраста. Именно в этой группе заболеваний эпилепсия фармакорезистентна, и именно здесь наиболее часто ведутся попытки разработки генотип-ориентированной терапии.

Обсуждая полученные в ходе нашего исследования результаты, мы в первую очередь хотим подчеркнуть высокую информативность именно полногеномного секвенирования в группе детей с сочетанием эпилепсии, интеллектуальных, двигательных и поведенческих расстройств. В нашем исследовании 102 (74,45%) из 137 пациентов имели генетические варианты, которые описывались как вероятно патогенные и патогенные. Большинство генетических вариантов были точковыми мутациями, и только у 14 (8,3%) из 168 пациентов отмечались вариации числа копий ДНК. Такие чрезвычайно высокие показатели информативности (по данным литературы, 40–50%)

Таблица 3. Соответствие фенотипа ребенка С.М. фенотипу, характерному для синдрома Кулена—Де Фриз
Table 3. The correspondence of the phenotype of the child to the phenotype which is characteristic for the Koolen—De Vries syndrome

Клинический синопсис в OMIM #610443 [5]	Наличие клинических проявлений у пробанда
Низкий рост (35%)	Нет
Внутриутробная гипотрофия	Да
Трудности при глотании	Да
Высокий и широкий лоб, вытянутое лицо, монголоидный разрез глаз, большие оттопыренные уши	Да
Пороки развития сердца	Да
Урологические аномалии	Да
Крипторхизм	Да
Аномальная пигментация волос и кожи (55%)	Нет
Задержка развития	Да
Плохое развитие речи	Да
Судороги	Да
Мышечная гипотония	Да
Вентрикуломегалия	Да
Аутистические черты и гиперактивность	Да

обусловлены, по нашему мнению, как экспертным отбором пациентов в исследование специалистами высокого уровня, так и тем фактором, что отдельные пациенты не проходили проверку данных полногеномного секвенирования методом Сэнгера ТРИО [8]. В то же время частота структурных перестроек хромосом 8,3% соответствует общепринятым показателям в 5–10% [9].

Современный алгоритм генетического обследования не выделяет какой-либо из генетических методов как единственный и всеобъемлющий, и при отрицательном результате в одном из исследований предлагается переходить к следующему виду технических ограничений каждого из методов. В нашем исследовании более чем у 50% детей при предыдущих обследованиях (биохимических и генетических) не удавалось установить этиологию эпилепсии. Полученные нами данные подтверждают хорошо известный факт, что полногеномное секвенирование в настоящее время является «вершиной» генетического обследования, но ввиду высокой стоимости такого исследования мы крайне редко с него начинаем.

К преимуществам полногеномного секвенирования можно отнести выявление не только одно- и мультинуклеотидных вариантов (SNV и MNV), но и малых вставок-делеций (ins/del) до 50 пар нуклеотидов, а также таких структурных вариантов, как делеции/микроделеции и дупликации/микродупликации раз-

личного размера, участки потери гетерозиготности и однородительские дисомии, варианты в митохондриальном геноме с детекцией гетероплазмы $>5\%$, сбалансированные хромосомные изменения с определением точек разрыва (с ограничениями), экспансию tandemных повторов [9].

В последние годы развернулась активная дискуссия о совпадении/несовпадении результатов, полученных методом NGS и методом исследования по Сэнгеру. Еще 10 лет назад в результаты полногеномного секвенирования и NGS-панелей выносились значительное количество ложноположительных вариантов вследствие артефактов из-за особенностей пробоподготовки [10]. Следует отметить, что такая особенность не распространяется на результаты современного высококачественного полногеномного секвенирования. В последние годы опубликованы научные работы, в которых обосновывается необязательность валидации высококачественных вариантов, полученных при NGS альтернативным методом у пробанда, поскольку высококачественные данные, полученные методом NGS и методом Сэнгера, практически полностью совпадают [11–13]. Это позволяет обсуждать результаты, полученные при полногеномном секвенировании как наличествующие у пробанда. Однако для валидации «кейса» редкого заболевания у больного, безусловно, необходимо (и в этом сходятся во мнении все авторы перечисленных публикаций последних лет) проведение сегрегационного анализа в семье, чтобы подтвердить статус мутации *de novo* (или выявить/обосновать наличие симптомов у родителя, имеющего тот же вариант, что у пробанда) у больного при аутосомно-доминантном типе наследования, наличие компаунд-гетерозиготы при аутосомно-рецессивном типе наследования и т.д. Данные родителей могут быть получены при проведении исследований в формате геном-трио (пробанд + родители) или Сэнгер-трио (пробанд + родители).

В представленном исследовании 122 пробандам проведено валидирование полученных результатов полногеномного исследования по методу Сэнгера. Среди этих 122 больных у всех результаты исследования по методу NGS и по методу Сэнгера совпали. Вариации числа копий и структурные варианты по Сэнгеру валидированы не были в силу ограничений метода. Сегрегационный анализ в семье проведен у 31 пробанда по методу Сэнгер-трио, у 19 пробандов по методу геном-трио.

Пациентам, у которых не найдена генетическая причина эпилепсии в нашем исследовании, мы можем рекомендовать полногеномное секвенирование трио (ребенок и его родители) и пересмотр данных геномного секвенирования через 1,5–2 года. Кроме того, весьма вероятно, что у некоторых таких пациентов эпилепсия имеет мультифакторный тип наследования.

Четкое установление генетического диагноза часто определяет прогноз течения болезни, прогноз дальнейшего деторождения. Так, в семьях с аутосомно-рецессивным ($n=14$) и X-сцепленным ($n=13$) типами наследования энцефалопатий развития и эпилептических, где родители являются бессимптомными носителями мутаций, в связи с высоким риском повторного рождения больных детей возможна его профилактика (проведение пренатальной, преимплантационной диагностики, использование донорских яйцеклеток и сперматозоидов). Установленный генетический диагноз позволяет избежать ненужных дополнительных и часто дорогостоящих методов исследования (биохимических, нейрорадиологических и др.), улучшает взаимопонимание по трудностям лечения между врачом и родителями пациента. Но основная его цель — применение генотип-ориентированной терапии. Генозаместительная терапия в лечении генетических эпилепсий пока отсутствует, хотя попытки ее разработки (в частности, при синдроме Драве) ведутся, находясь на стадии экспериментальных работ [14, 15]. Существуют и другие моногенные эпилепсии — кандидаты для генной терапии: эпилепсии, обусловленные патогенными генетическими вариантами в генах *SLC13A5*, *WWOX*, *TBC1D24* и др. [16]. Конечно, важно обнаружение в нашем исследовании пациентов, для которых возможна генотип-ориентированная патогенетическая терапия. Это, в частности, пациент с дефицитом GLUT1 (ген *SLC2A*), у которого потенциально высокоэффективна кетогенная диета. Известно, что кетоны представляют собой альтернативный источник энергии при этом заболевании и кетогенная диета уменьшает не только число эпилептических приступов, но и степень выраженности когнитивного и двигательного дефицита [17]. Другими яркими примерами генотип-ориентированной патогенетической терапии служат применение эверолимуса при фармакорезистентной эпилепсии, ассоциированной с туберозным склерозом, введение церлипиназы-альфа у пациентов с нейрональным цероидным липофусцинозом 2-го типа, заместительная витаминотерапия при пиридоксин- и/или пироксальфосфат-5-зависимой эпилепсии и т.д. [18, 19].

Конечно, наиболее распространена в настоящее время генотип-ориентированная симптоматическая терапия. Считается, что изменение симптоматической (в основном противосудорожной) терапии может принести позитивный эффект в виде уменьшения частоты приступов примерно у 30% всех пациентов с моногенными эпилепсиями [20]. Последним по времени примером такого подхода служит применение ганаксолона (нейростероида, нарушения обмена нейростероидов имеются при данном заболевании) при *CDKL5*-энцефалопатии и эпилептической [21]. Несмотря на то что препарат не зарегистри-

стрирован в Российской Федерации, 6 российских пациентов, участвовавших в международных клинических испытаниях его эффективности, продолжают успешно его использовать на протяжении 2–3 лет. Другими примерами служат применение фенфлюрамина и стирепентола при синдроме Драве (не зарегистрированы в Российской Федерации), нецелесообразность применения блокаторов натриевых каналов при этом же синдроме, эффективность пульсовой гормональной терапии в купировании кластеров приступов при *PCDH19*-кластерной эпилепсии, эффективное применение мемантина у некоторых пациентов с энцефалопатией развития и эпилептической, обусловленной патогенным генетическим вариантом в гене *GRIN2D* и др.

Немаловажно и то, что практически все редкие генетические синдромы с эпилепсией имеют свой алгоритм наблюдения и ведения пациентов. Существуют международные рекомендации по ведению пациентов с синдромом Драве, *CDKL5*-энцефалопатией, *PCDH19*-кластерной эпилепсией и многими другими генетическими энцефалопатиями развития и эпилептическими [22–24]. То же самое касается и эпонимных синдромов с эпилепсией и задержкой развития. Выше мы приводили пример пациента с синдромом Кулена–де Фриза, при котором необходимо наблюдение за массой тела и ростом ребенка. Такие же схемы врачебного наблюдения и обследо-

вания есть и при других генетических синдромах. Приведем только один пример: при синдроме Фелан–Мак-Дермид (он был диагностирован у одного из наших пациентов) имеются не только общие рекомендации по наблюдению пациентов, но и отдельные консенсусные рекомендации по диагностике и лечению эпилепсии, сенсорных нарушений, трудностей вскармливания и желудочно-кишечных проблем, нарушений сна и т.д. [25–27]. Наблюдение и лечение пациента мультидисциплинарной командой самых разных специалистов, безусловно, повышает качество его жизни и жизни его семьи даже в отсутствие генотип-ориентированной терапии [28].

Заключение

Прогресс в изучении генетических эпилепсий наряду с расширением диагностических и в меньшей степени лечебных мероприятий приводит к определенным сложностям для клинициста и системы здравоохранения в целом. В дальнейшем будет увеличиваться количество вновь выявляемых редких генетических вариантов, усложняя тем самым диагностику и трактовку полученных генетических данных. Для решения этого вопроса необходима координированная работа эпилептологов, генетиков и биологов/биоинформатиков, что может улучшить лечение, адекватное медико-генетическое консультирование и корректный прогноз у наших пациентов.

ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES)

1. Шарков А.А., Шаркова И.В., Белоусова Е.Д., Дадали Е.Л. Генетика и дифференцированное лечение ранних эпилептических энцефалопатий. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова 2016; 116(9–2): 67–73. [Sharkov A.A., Sharkova I.V., Belousova E.D., Dadali E.L. Genetics and differentiated treatment of early epileptic encephalopathies. Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova 2016; 116(9–2): 67–73. (in Russ.)] DOI: 10.17116/jnevro20161169267–73
2. Leu C., Stevelink R., Smith A.W., Goleva S.B., Kanai M., Ferguson L., et al. Epi25 Consortium; Lal D. Polygenic burden in focal and generalized epilepsies. Brain 2019; 142(11): 3473–3481. DOI: 10.1093/brain/awz292
3. Thakran S., Guin D., Singh P., Singh P., Kukal S., Rawat C. et al. Genetic Landscape of Common Epilepsies: Advancing towards Precision in Treatment. Int J Mol Sci 2020; 21(20): 7784. DOI: 10.3390/ijms21207784
4. OMIM (An Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorders) https://www.omim.org/search?index=entry&start=1&limit=10&sort=score+desc%2C+prefix_sort+desc&search=DDE / Ссылка активна на 13.02.2024.
5. OMIM (An Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorders) <https://www.omim.org/entry/610443?search=%23610443&highlight=610443> / Ссылка активна на 13.02.2024.
6. Koolen D.A., Morgan A., de Vries B.B.A. Koolen-de Vries Syndrome. 2010 Jan 26 [updated 2023 Feb 2]. In: GeneReviews® [Internet]. Editors Adam M.P., Mirzaa G.M., Pagon R.A., Wallace S.E., Bean L.J.H., Gripp K.W., Amemiya A. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2023
7. Raga S., Specchio N., Rheims S., Wilmschurst J.M. Developmental and epileptic encephalopathies: recognition and approaches to care. Epileptic Disord 2021; 23(1): 40–52. DOI: 10.1684/epd.2021.1244
8. Lee S., Karp N., Zapata-Aldana E., Sadikovic B., Yang P., Balci T.B., Prasad A.N. Genetic Testing in Children with Epilepsy: Report of a Single-Center Experience. Can J Neurol Sci 2021; 48(2): 233–244. DOI: 10.1017/cjn.2020.167
9. Colin E., Duffourd Y., Tisserant E., Relator R., Bruel A.L., Tran Mau-Them F. et al. A OMIXCARE: OMICS technologies solved about 33% of the patients with heterogeneous rare neuro-developmental disorders and negative exome sequencing results and identified 13% additional candidate variants. Front Cell Dev Biol 2022; 10: 1021785. DOI: 10.3389/fcell.2022.1021785
10. Rehm H.L., Bale S.J., Bayrak-Toydemir P., Berg J.S., Brown K.K., Deignan J.L., et al. Working Group of the American College of Medical Genetics and Genomics Laboratory Quality Assurance Committee. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. Genet Med 2013; 15(9): 733–747. DOI: 10.1038/gim.2013.92
11. De Caro R., Kura A., Suraci S., Magi A., Volta A., Marcucci R. et al. Sanger Validation of High-Throughput Sequencing in Genetic Diagnosis: Still the Best Practice? Front Genet 2020; 11: 592588. DOI: 10.3389/fgene.2020.592588
12. Souche E., Beltran S., Brosens E., Belmont J.W., Fossum M., Riess O. et al. Recommendations for whole genome sequencing in diagnostics for rare diseases. Eur J Hum Genet 2022; 30: 1017–1021. DOI: 10.1038/s41431–022–01113-x

13. Bauer P., Kandaswamy K.K., Weiss M.E.R., Paknia O., Werber M., Bertoli-Avella A.M. et al. Development of an evidence-based algorithm that optimizes sensitivity and specificity in ES-based diagnostics of a clinically heterogeneous patient population. *Genet Med* 2019; 21(1): 53–61. DOI: 10.1038/s41436-018-0016-6
14. Hebbar M., Mefford H.C. Recent advances in epilepsy genomics and genetic testing. *F1000Res*. 2020; 9: F1000 Faculty Rev-185. DOI: 10.12688/f1000research.21366.1
15. He Z., Li Y., Zhao X., Li B. Dravet syndrome: Advances in etiology, clinical presentation, and treatment. *Epilepsy Res* 2022; 188: 107041. DOI: 10.1016/j.eplepsyres.2022.107041
16. Goodspeed K., Bailey R.M., Prasad S., Sadhu C., Cardenas J.A., Holmay M. et al. Gene Therapy: Novel Approaches to Targeting Monogenic Epilepsies. *Front Neurol* 2022; 13: 805007. DOI: 10.3389/fneur.2022.805007
17. Fujii T., Ito Y., Takahashi S., Shimono K., Natsume J., Yanagihara K. et al. Outcome of ketogenic diets in GLUT1 deficiency syndrome in Japan: a nationwide survey. *Brain Dev* 2016; 38: 628–637. DOI: 10.1016/j.braindev.2016.01.002
18. Григорьева А.В., Дорофеева М.Ю., Перминов В.С., Белоусова Е.Д. Ретроспективный анализ эффективности и переносимости лечения эверолимусом фармакорезистентной эпилепсии, ассоциированной с туберозным склерозом. *Альманах клинической медицины* 2020; 48(1): 1–6. [Grigorieva A.V., Dorofeeva M.Yu., Perminov V.S., Belousova E.D. A retrospective analysis of the effectiveness and tolerability of treatment with everolimus for pharmacoresistant epilepsy associated with tuberous sclerosis. *Al'manakh klinicheskoi meditsiny* 2020; 48(1): 1–6. (in Russ.)] DOI: 10.18786/2072-0505-2020-48-003
19. Zimmern V., Minassian B., Korff C. A Review of Targeted Therapies for Monogenic Epilepsy Syndromes. *Front Neurol* 2022; 13: 829116. DOI: 10.3389/fneur.2022.829116
20. Balestrini S., Chiarello D., Gogou M., Silvennoinen K., Puvi-rajasinghe C., Jones W.D. et al. Real-life survey of pitfalls and successes of precision medicine in genetic epilepsies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2021; 92(10): 1044–1052. DOI: 10.1136/jnnp-2020
21. Lamb Y.N. Ganaxolone: First Approval. *Drugs* 2022; 82(8): 933–940. DOI: 10.1007/s40265-022-01724-0
22. Wirrell E.C., Hood V., Knupp K.G., Meskis M.A., Nababout R., Scheffer I.E. et al. International consensus on diagnosis and management of Dravet syndrome. *Epilepsia*. 2022;63(7):1761–1777. DOI: 10.1111/epi.17274
23. Leonard H., Downs J., Benke T.A., Swanson L., Olson H., Demarest S. CDKL5 deficiency disorder: clinical features, diagnosis, and management. *Lancet Neurol* 2022; 21(6): 563–576. DOI: 10.1016/S1474-4422(22)00035-7
24. Samanta D. PCDH19-Related Epilepsy Syndrome: A Comprehensive Clinical Review. *Pediatr Neurol* 2020; 105: 3–9. DOI: 10.1016/j.pediatrneurol.2019.10.009
25. de Coe I.F.M., Jesse S., Le T.L., Sala C.; European Phelan-McDermid syndrome consortium. Consensus recommendations on Epilepsy in Phelan-McDermid syndrome. *Eur J Med Genet* 2023; 66(6): 104746. DOI: 10.1016/j.ejmg.2023.104746
26. Walinga M., Jesse S., Alhambra N.; European Phelan-McDermid syndrome consortium; Van Buggenhout G. Consensus recommendations on altered sensory functioning in Phelan-McDermid syndrome. *Eur J Med Genet* 2023; 66(5): 104726. DOI: 10.1016/j.ejmg.2023.104726
27. San José Cáceres A., Landlust A.M., Carbin J.M.; European Phelan-McDermid Syndrome consortium; Loth E. Consensus recommendations on sleeping problems in Phelan-McDermid syndrome. *Eur J Med Genet* 2023; 66(6): 104750. DOI: 10.1016/j.ejmg.2023.104750
28. Striano P., Minassian B.A. From Genetic Testing to Precision Medicine in Epilepsy. *Neurotherapeutics* 2020; 17(2): 609–615. DOI: 10.1007/s13311-020-00835-4

Поступила: 11.12.23

Received on: 2023.12.11

Конфликт интересов:

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов и финансовой поддержки, о которых необходимо сообщить.

Conflict of interest:

The authors of this article confirmed the lack of conflict of interest and financial support, which should be reported.