

## Высокопроизводительное секвенирование ДНК для идентификации генетически детерминированных заболеваний в педиатрической практике

В.Ю. Воинова, Е.А. Николаева, Н.В. Щербакова, М.И. Яблонская

ОСП «Научно-исследовательский клинический институт педиатрии им. акад. Ю.Е. Вельтищева» ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

## High-performance DNA sequencing to identify genetically determined diseases in pediatric practice

V.Yu. Voinova, E.A. Nikolaeva, N.V. Shcherbakova, M.I. Yuablonskaya

Veltishev Research and Clinical Institute for Pediatrics of the Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Технология секвенирования нового поколения (NGS) за последние годы стала важным диагностическим инструментом в педиатрии. В генетической педиатрической клинике проанализированы результаты применения полноэкзомного секвенирования у 42 детей с задержкой психического, физического развития и/или аномалиями различных органов и систем. У 19 больных был установлен первичный генетический диагноз, и, таким образом, эффективность экзомного секвенирования составила 45%, что несколько выше эффективности NGS, приводимой в источниках литературы. В статье представлены клинические наблюдения случаев первичного, возможного, двойного диагноза, прогностического вторичного варианта, примеры ошибок в интерпретации данных секвенирования. Подчеркивается важность исследования выявленных мутаций в семьях не только у родителей, но и других родственников пациента. В частности, в случае идентификации X-сцепленных генетических вариантов обосновывается необходимость их анализа в трех поколениях семьи.

**Ключевые слова:** дети, наследственные болезни, полноэкзомное секвенирование, секвенирование нового поколения, интерпретация данных секвенирования, первичный диагноз, возможный диагноз, двойной диагноз, прогностический вторичный вариант.

**Для цитирования:** Воинова В.Ю., Николаева Е.А., Щербакова Н.В., Яблонская М.И. Высокопроизводительное секвенирование ДНК для идентификации генетически детерминированных заболеваний в педиатрической практике. Рос вестн перинатол и педиатр 2019; 64:(1): 103–109. DOI: 10.21508/1027-4065-2019-64-1-103-109

In recent years the technology of new generation sequencing technology (NGS) has become an important diagnostic tool in pediatrics. In the genetic pediatric clinic there were analyzed the results of the use of full exome sequencing in 42 children with the retardation of mental and physical development and / or abnormalities of various organs and systems. There was established a primary genetic diagnosis in 19 patients, and thus, the effectiveness of exomic sequencing was 45%, which is slightly higher than the effectiveness of NGS given in the literature sources. The article presents clinical observations of the cases of primary, or double diagnosis, prognostic secondary variant, examples of errors in the interpretation of sequencing data. The authors emphasize the importance of studying family mutations not only among the parents, but also other relatives of the patient. In particular, in case of the identification of X-linked genetic variants, the authors justify the necessity of analysis in three family generations.

**Key words:** children, hereditary diseases, full-exicinal sequencing, new generation sequencing, interpretation of sequencing data, primary diagnosis, possible diagnosis, double diagnosis, prognostic secondary variant.

**For citation:** Voinova V.Yu., Nikolaeva E.A., Shcherbakova N.V., Yablonskaya M.I. High-performance DNA sequencing to identify genetically determined diseases in pediatric practice. Ros Vestn Perinatol i Pediatr 2019; 64:(1): 103–109 (in Russ). DOI: 10.21508/1027-4065-2019-64-1-103-109

За последнее десятилетие стала особенно очевидна значимость наследственных заболеваний в общей патологии детского возраста. Изменилось отношение к наследственным болезням (около 6000 нозо-

логических форм) как к исключительно редким состояниям. Появилась четкая информация о высокой (более 34%) распространенности этих заболеваний среди пациентов педиатрических стационаров; показано, что наследственные болезни определяют более 50% случаев детской инвалидности и смертности [1]. Установление точного диагноза клиническими методами нередко затруднено в силу недостаточной специфичности проявлений, отсутствия лабораторных маркеров, необходимости дифференцирования со многими фенотипически сходными состояниями. Между тем генетическая верификация диагноза исключительно важна для выявления заболеваний, поддающихся лечению, определения точных рисков повторения болезни для членов семьи и информирования о прогнозе развития больного ребенка [2].

Технология секвенирования нового поколения (Next-Generation Sequencing, NGS) — относительно

© Коллектив авторов, 2019

Адрес для корреспонденции: Воинова Виктория Юрьевна — д.м.н., гл. н.с. отдела клинической генетики Научно-исследовательского клинического института педиатрии им. академика Ю.Е. Вельтищева, ORCID: 0000-0001-8491-0228

Николаева Екатерина Александровна — д.м.н., рук. отдела клинической генетики Научно-исследовательского клинического института педиатрии им. академика Ю.Е. Вельтищева, ORCID: 0000-0001-7146-7220

Яблонская Мария Игоревна — к.м.н., ст.н.с. отдела клинической генетики Научно-исследовательского клинического института педиатрии им. академика Ю.Е. Вельтищева, ORCID: 0000-0002-7233-4048

Щербакова Наталья Владимировна — зав. лабораторией молекулярной и биохимической диагностики Научно-исследовательского клинического института педиатрии им. академика Ю.Е. Вельтищева, ORCID: 0000-0002-6672-4242

125412 Москва, ул. Талдомская, д.2

недавно предложенный метод молекулярно-генетического анализа — находит все большее диагностическое применение в педиатрии. По данным ряда авторов, при обследовании детей с задержкой развития/умственной отсталостью и аутизмом достичь диагностически значимого результата этим методом удается в 3 раза чаще, чем при использовании хромосомного микроматричного анализа [3, 4].

### Особенности метода NGS

NGS представляет собой современную технологию, позволяющую одновременно параллельно определять последовательность нуклеотидов многих фрагментов ДНК. Только 1% последовательностей ДНК человека кодирует белки и носит название «экзом». Экзом организован в примерно 22 тыс. генов и, как принято считать, содержит 85% известных или потенциальных генетических вариантов, вызывающих болезни. В то же время вся последовательность ДНК человека (кодирующие белки и некодирующие области) называется геномом. Поэтому секвенирование генома представляет собой секвенирование всего генетического кода человека, а секвенирование экзома относится только к частям генома, которые содержат белок-кодирующие гены. Оба метода считают полногеномными.

Для обоих подходов лабораторное исследование начинается с изоляции ДНК из клеток. После экстракции ДНК «разбивают» на короткие фрагменты (от 100 до 150 пар оснований), данные фрагменты подвергают процессу, называемому подготовкой библиотек. Для секвенирования экзома требуется дополнительная процедура обогащения, чтобы «захватить» только информацию, кодирующую белки и содержащуюся в экзонах. Технология секвенирования «читает» генетический код этих коротких последовательностей ДНК несколько раз параллельно. С использованием инструментов биоинформатики данные последовательности сопоставляются с определенными положениями в контрольной последовательности генома человека, идентифицируются сходства и различия между последовательностью пациента и референсной последовательностью [5, 6].

В ходе интерпретации данных секвенирования определяют, какие варианты в геноме пациента могут быть клинически значимыми. Это требует поиска возможной связи между фенотипом и потенциально релевантными вариантами в генах, которые идентифицируются у пациента. Для решения этой комплексной задачи в настоящее время интерпретацию лучше всего проводить многопрофильной командой, включающей биоинформатика (выделяет генетические варианты, которые согласно своим характеристикам могут вызывать заболевание, анализирует обнаруженные варианты с использованием соответствующего программного обеспечения), медицинского генетика, имеющего опыт диагностики редких

болезней, и клинициста, проводившего обследование пациента [7].

Результаты секвенирования прежде всего фильтруются в отношении редких вариантов (т.е. вариантов, наблюдаемых у менее 1% населения). Последовательность экзома обычно генерирует 150–250 таких вариантов, тогда как последовательность генома может генерировать до 10 тыс. [8]. Основываясь на клинических особенностях пациента и предполагаемом или определенном через тестирование родителей типе наследования, члены многопрофильной команды просматривают опубликованную литературу и различные базы данных о геномных вариациях (например, Human Gene Mutation Database, ClinVar, Лейденскую базу данных) для доказательства предполагаемой связи между выявленными генетическими вариантами и клиническими проявлениями у пациента [5].

### Категории результатов, получаемых при анализе данных NGS

На основании современной системы классификации генетических вариантов Американской коллегии медицинской генетики (ACMG) [9], при секвенировании экзома/генома могут быть получены следующие категории результатов: первичный диагноз, возможный диагноз, неинформативный тест, двойной диагноз, прогностический вторичный вариант и фармакогеномный вариант.

О **первичном диагнозе** принято говорить в случае, если патогенный генетический вариант идентифицирован в гене, вызывающем наблюдаемое у ребенка заболевание. Частота выявления первичных диагнозов с использованием экзомного/геномного секвенирования приближается к 30–40% для детей с задержкой развития и врожденными аномалиями [4, 10]. В отделе клинической генетики Научно-исследовательского клинического института им. акад. Ю.Е. Вельтищева проанализированы результаты применения экзомного секвенирования у 42 детей с задержкой психического, физического развития и/или аномалиями различных органов и систем, среди которых в 19 случаях был установлен первичный генетический диагноз. Эффективность экзомного секвенирования в постановке первичных диагнозов, таким образом, составила 45%, что несколько выше приводимой в источниках литературы; по-видимому, это объясняется строгим предварительным отбором с использованием клинико-генеалогического, цитогенетического и молекулярно-цитогенетического методов.

В качестве примера первичного диагноза можно привести наблюдение за единственным в семье случаем задержки роста, нарушения обучения и поведения у 17-летнего мальчика. Генетиком по месту жительства был предположен синдром Рассела–Сильвера, а также назначено стандартное цитогенетическое исследование — кариотип 46XY. При поступлении пробанда

в генетическую клинику отмечены низкорослость (длина тела менее 3-го центиля), избыток массы тела, умеренное отставание в психическом развитии. Комплекс микроаномалий включал низкий рост волос на лбу, диспластичные ушные раковины с насечками на мочке справа, преаурикулярные ямки, длинную спинку носа с удлинённой *columella*, недоразвитие крыльев носа, короткий филтрум, неправильный рост зубов, тонкие губы, выраженную клинодактилию мизинцев, брахидактилию (особенно III и IV пальцев стоп), широкие большие пальцы кистей и стоп. На основании клинических данных сделан вывод об отсутствии синдрома Рассела–Сильвера, предположено наличие синдрома Флотинг–Харбор с необходимостью дифференциального диагноза с синдромами Рубинштейна–Тейби и Халермана–Штрайфа. В результате экзомного секвенирования идентифицирована ранее описанная патогенная мутация (в гетерозиготном состоянии) гена *SRCAP* p.Arg2435Ter (c.7303C>T, NM\_006662.2), связанного с синдромом Флотинг–Харбор, что подтвердило данный диагноз в качестве первичного.

Другим примером постановки первичного диагноза с помощью NGS может служить случай патологии скелета у девочки 3 лет (персистирующие открытые большой родничок и сагиттальный шов черепа, ранняя потеря молочных зубов, гипоплазия ключиц, гипертелоризм, высокий и широкий лоб, а также задержка роста). При секвенировании экзома была определена описанная ранее как причина аутосомно-доминантного заболевания – черепно-ключичной дисплазии – миссенс-мутация в 4-м экзоне гена *RUNX2*: p.Arg190Trp (c.568C>T, NM\_001015051.3) в гетерозиготном состоянии. Симптомы черепно-ключичной дисплазии в целом соответствовали клиническим проявлениям у пациентки. При исследовании указанного генетического варианта у пробанда и его родителей методом секвенирования по Сенгеру определено, что он возник у ребенка *de novo*. Совокупность данных позволяет расценивать этот случай как первичный диагноз.

**Возможный диагноз** возникает в случае, если идентифицируются варианты неопределённого значения (variants of uncertain significance – VUS), которые ни подтверждают, ни опровергают генетическую этиологию наблюдаемого у пациента симптомокомплекса. VUS представляют собой значительную проблему в молекулярной генетике, а с появлением NGS эти варианты стали идентифицироваться с высокой частотой [6, 7]. Специалисты Американской коллегии медицинской генетики советуют использовать определенные характеристики для принятия решения о патогенности VUS. К ним относятся тип мутации, частота варианта в контрольных базах данных и базах данных по заболеваниям, его прогнозируемая патогенность, основанная на анализе *in silico* с помощью компьютерных программ, а также тип наследования [10]. Например, если вариант не унаследован

от родителя (возник *de novo*) и связан с доминантным заболеванием, то высоковероятна его патогенность. В качестве дополнительных исследовательских инструментов для определения связи VUS с заболеванием используют анализ экспрессии генов, определение активности ферментов, локализации белков и моделирование заболевания на животных [5, 11].

В частности, у 11-летнего мальчика с задержкой психического развития и неврологическими расстройствами с помощью полноэкзомного секвенирования определена ранее не описанная гомозиготная мутация во 2-м интроне гена *TBCE*, приводящая к нарушению канонического сайта сплайсинга (c.100+1G>A, NM\_001079515.2). На основании сочетания у ребенка признаков периферических нервно-мышечных нарушений и живых сухожильных рефлексов (амиотрофия) с когнитивным дефицитом, а также принимая во внимание характер мутации с нарушением сайта сплайсинга и данные литературы о фенотипах, обусловленных мутациями в гене *TBCE*, можно сделать предположение о прогрессирующей энцефалопатии с амиотрофией (OMIM 617207). Однако поскольку идентифицированный конкретный генетический вариант ранее не описывался у больных с указанным заболеванием, интерпретировать этот случай как первичный диагноз некорректно и следует расценивать его как возможный диагноз. Следующим этапом на пути доказательства связи выявленного нуклеотидного варианта с заболеванием у мальчика должен стать анализ сегрегации этого генетического варианта в семье: исследование методом секвенирования по Сенгеру у пробанда, его сибсов и родителей.

**Неинформативный результат** исследования возникает в случае, если патогенные варианты не обнаруживаются, если выявляется вариант, который не имеет отношения к клиническим признакам у ребенка, или идентифицированный вариант не описан в связи с какими-либо заболеваниями человека [12]. Пациенты с неинформативными результатами имеют шансы получить генетический диагноз при повторном анализе секвенса позднее. Благодаря обмену данными о генотипах и фенотипах с помощью международных платформ, вероятность поиска соответствия фенотипа пациента генетическим вариантам, приводящая к корректной диагностике, значительно возрастает [13, 14]. В результате такого сотрудничества обнаружение многих генов редких заболеваний за последние 5 лет произошло быстрыми темпами. Таким образом, повторный анализ данных может дать новую диагностическую информацию спустя всего 1 год. Например, после переоценки результатов 40 «неясных» случаев генетический диагноз был идентифицирован у 10% больных благодаря новым научным сведениям, появившимся в течение одного предшествующего года [15]. Данные секвенирования у детей, которым установлен возможный (а не окончательный) диагноз, также могут быть подвергнуты повторному анализу.

О **двойном диагнозе** говорят, если идентифицируются мутации в более чем одном гене, вызывающем заболевание. При этом каждый вариант дает частичное объяснение клинической картины пациента. Ранее в литературе сообщалось о двойных диагнозах у 4–15% больных [4, 16].

Нами неоднократно наблюдались дети с двойным диагнозом, который был получен как при NGS, так и при сочетании NGS с другими генетическими технологиями (MLPA, молекулярное кариотипирование). Так, наблюдалась больная 10-летнего возраста, у которой были установлены два диагноза: синдром Корнелии де Ланге и синдром Ангельмана. У девочки с помощью молекулярного кариотипирования определен критический для синдрома Ангельмана участок потери гетерозиготности на хромосоме 15 (данные молекулярного кариотипирования агт 15q11.2(24,251,567-25,253,314)x2hmz); кроме того, при секвенировании экзона найдена мутация p.Met769Ile (с.2307G>T, NM\_006306.3) в гене *SMC1A*, связанном с синдромом Корнелии де Ланге 2-го типа. У пробанда при этом сформировался «промежуточный» фенотип: лицевые микроаномалии (синофрив, густые брови и ресницы), типичные для синдрома Корнелии де Ланге, судороги и двигательные нарушения (атаксия, движения «механической куклы»), типичные для синдрома Ангельмана, а также характерные для обоих заболеваний микроцефалия и умственная отсталость.

Еще один из случаев наблюдавшегося нами двойного диагноза представлял собой смешанный фенотип, возникший в результате сочетания моторно-сенсорной полинейропатии Шарко–Мари–Тута типа A1 и нейрофиброматоза 1-го типа у мальчика 15 лет. У ребенка отмечались следующие признаки нейрофиброматоза: множественные пятна цвета «кофе с молоком» в области туловища размером около 2×2 см, единичные кожные нейрофибромы в области спины; при магнитно-резонансной томографии головного мозга в ножках мозга и в основании височных долей визуализировались симметрично расположенные очаги измененного магнитно-резонансного сигнала, характерные для нейрофиброматоза 1-го типа. Отмечались также симптомы моторно-сенсорной полинейропатии Шарко–Мари–Тута: гипотрофия мышц конечностей, тугоподвижность в лучезапястных суставах, деформации стоп, сгибательные контрактуры II–IV пальцев стоп, снижение силы мышц конечностей, нарушение походки, парестезии в конечностях, нарушение осанки; по данным электронейромиографии имелись признаки демиелинизирующего поражения волокон нервов medianus I., ulnaris I., tibialis I., peroneus I. В результате секвенирования в кодирующей области гена *NFI* выявлена ранее описанная у пациентов с нейрофиброматозом 1-го типа однонуклеотидная замена p.Gly629Arg (с.1885G>A, NM\_001042492.2) в гетерозиготном состоянии, а при MLPA-исследовании была определена характерная для болезни Шарко–Мари–Тута типа IA

дупликация последовательности ДНК хромосомы 17 (17p11.2–p.12), захватывающая ген *PMP22*.

К **прогностическим вторичным вариантам**, ранее известным как «случайные» находки, относятся патогенные или вероятно патогенные варианты, не связанные с заболеваниями, которые послужили основанием для направления на генетическое обследование [9]. Американская коллегия медицинских генетиков выпустила отдельный документ, содержащий рекомендации по работе с такими вариантами, а также опубликовала список из 59 генов, в которых рекомендован поиск подобных вариантов при проведении экзомного или геномного секвенирования (в случае согласия пациента или его законного представителя на получение информации) [17]. Целью сообщения вторичных вариантов для заболеваний с высокой пенетрантностью является управление рисками посредством вмешательств, направленных на предотвращение или существенное снижение заболеваемости и смертности. Прогностические вторичные варианты обычно разделяют на 4 группы: 1) статус носительства рецессивных заболеваний; 2) варианты, связанные с развитием заболевания в более позднем возрасте; 3) варианты, связанные с семейной предрасположенностью к развитию рака; 4) варианты, связанные с развитием заболевания в относительно раннем возрасте [18]. Согласно сведениям S.A. Fowler и соавт. [19] в 83% проанализированных информированных согласий содержалась возможность для пациента самостоятельно управлять объемом сообщенной информации относительно вторичных находок. В более ранних работах было показано, что 93,5% пациентов желают получить прогностические вторичные результаты экзомного секвенирования [18]. Среди взрослых пациентов 16% отказались от получения вторичных прогностических вариантов, что статистически значимо отличалось от 4% родителей/опекунов, которые выбирали эту опцию при тестировании своих детей [18]. Вопрос о сообщении прогностических вариантов родителям педиатрических пациентов с ограниченной продолжительностью жизни и малыми возможностями принятия решений в будущем широко обсуждается, и консенсус по этому вопросу пока не достигнут [20].

В качестве примера прогностического вторичного варианта можно привести случайную находку описанного в литературе генетического варианта p.Arg527Pro гена *LMNA* (с.1580G>C, NM\_170707.3), связанного с аутосомно-доминантной формой мышечной дистрофии Эмери–Дрейфуса 2-го типа, обычно манифестирующей не ранее 2-го десятилетия жизни. Данная аминокислотная замена была найдена у 5-летней девочки, обследованной по поводу задержки психического и речевого развития в сочетании с аутизмом, деформацией грудной клетки и микроаномалиями. Причина нарушений интеллекта у ребенка была определена при молекулярном кариотипировании как синдром делеции 3q29. Признаков мышечной дистрофии

у ребенка не наблюдалось, однако у ее отца в возрасте 31 года появились неуверенность при ходьбе, слабость мышц конечностей, начали развиваться контрактуры и отмечено повышение уровня креатинфосфокиназы в крови. Заболевание отца привело к согласию родителей на сообщение им информации о вторичных находках при секвенировании, дополнительному обследованию отца и доклинической диагностике мышечной дистрофии Эмери–Дрейфуса 2-го типа у пробанда.

**Фармакогеномными вариантами** называют изменения в генах, участвующих в метаболизме лекарственных средств. Существует ряд препятствий, мешающих широкому клиническому использованию фармакогеномных вариантов. В частности, отсутствуют четкие рекомендации по тому, как перевести фармакогенетические данные в клинические действия. Это связано со сложностью номенклатурных систем, таких как номенклатура аллелей человека CYP ([www.pharmvar.org](http://www.pharmvar.org)), нечеткими стандартами информирования о таких вариантах или несогласием профессиональных сообществ; последнее обычно происходит из-за отсутствия рандомизированных клинических исследований, демонстрирующих преимущества фармакогенетического тестирования по сравнению со стандартным подходом в терапии. Другой сложностью является частое отсутствие эффективных альтернативных методов лечения пациентов с генетическими вариантами, ассоциированными с высоким риском развития осложнений предлагаемой лекарственной терапии [21].

Тем не менее генетических вариантов, связанных с низкой эффективностью препарата или риском возникновения нежелательных явлений, описано уже достаточно много и они все чаще используются в клинической практике. Список фармакогеномных вариантов можно найти в базе знаний PharmacoGenomics (PharmGKB) [22] и на сайте Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов США (FDA) [23]. Ввиду того что фармакогеномные варианты напрямую не вызывают заболевания, к ним применяется терминология, связанная с метаболизмом лекарств (быстрый, промежуточный или плохой), эффективностью препаратов (резистентный, чувствительный) или используется понятие «рисковый» аллель [9]. Главной целью сбора и анализа фармакогенетической информации в настоящее время является возможность оптимизации терапии — выбор препарата, который улучшил бы соотношение риска и пользы для конкретного пациента. В одной из описанных ранее когорт 95 из 98 детей имели по крайней мере один клинически значимый фармакогеномный вариант, следовательно, превентивный фармакогенетический скрининг может способствовать безопасности пациентов [24].

### Ограничения метода NGS

Для высокопроизводительного секвенирования существуют определенные аналитические ограничения.

Метод не может быть использован в качестве единственного для обнаружения всех клинически значимых генетических изменений. Так, с помощью высокопроизводительного секвенирования не могут быть выявлены крупные инсерции и делеции, хромосомные перестройки, полиплоидия, оценен уровень метилирования, вариации числа повторов (в том числе триплетов). Существуют ограничения по обнаружению мутаций в областях генома, которые трудно подвергнуть секвенированию (GC-богатые участки), имеются сложности по детекции мутаций в генах, для которых существует псевдоген (близкий по последовательности паралог), и мутаций в состоянии мозаицизма. Кроме того, недостаточно сведений о том, как интерпретировать мутации в интронных областях (за исключением канонических сайтов сплайсинга). Таким образом, хотя технически проведение анализа всего генома стало в настоящее время доступным, имеются сложности в интерпретации полученных результатов.

Помощь в интерпретации оказывают базы данных (как общедоступные, частные, так и лабораторные базы данных), медицинская литература, дополнительная информация о пациенте, клинический опыт врача и коллегиальное обсуждение [25]. Вызывающие заболевание генетические варианты, о которых имеются сведения в литературе и в крупных базах данных, могут быть ошибочными. Сообщалось, что частота ошибок колеблется от 4 до 23% [26, 27]. Появление ошибок усугубляется тем, что функциональные исследования, которые характеризуют влияние нуклеотидного варианта на экспрессию генов или взаимодействие белков, обычно недоступны в клинических условиях [28].

Так, нами наблюдался 3-летний ребенок с глубокой задержкой психомоторного развития, аутистическими чертами, низким гармоничным физическим развитием; заболевание у ребенка связывали с вероятно патогенным X-сцепленным вариантом c.1286A>T (p.Lys429Met) гена *MECP2*, описанным ранее в одной публикации у мальчика с ранней прогрессирующей энцефалопатией [29]. Авторы публикации указали, что патогенность этого нуклеотидного варианта носит предположительный характер, поскольку он унаследован пробандом от матери, не имевшей неслучайной инактивации хромосомы X. Предположение авторов о патогенности c.1286A>T основывалось на его крайне низкой частоте (описанный авторами случай — единственный), замене полярной аминокислоты Lys на неполярную Met, локализации в высококонсервативном участке гена *MECP2* и том обстоятельстве, что отсутствие неслучайной инактивации хромосомы X в лимфоцитах периферической крови матери не исключает наличие таковой в клетках ее головного мозга. В нашем случае для уточнения патогенности данного нуклеотидного варианта был проведен анализ его сегрегации в семье, который показал его передачу пробанду от матери,

получившей, в свою очередь, этот вариант от своего здорового отца (деда пробанда). Таким образом, нами были показаны ошибочность связи заболевания пробанда с заменой p.Lys429Met (c.1286A>T, NM\_001110792.1) гена *MECP2*, а также отсутствие патогенности данного генетического варианта. Этот пример демонстрирует важность исследования выявленных мутаций не только у родителей, но и у других родственников пациента. В частности, в случае наличия X-сцепленных генетических вариантов обоснована необходимость их анализа в трех поколениях семьи.

### Заключение

Генетическое тестирование за последние несколько десятилетий прочно вошло в педиатрическую практику. Среди всех существующих в настоящее

время технологий такие, как секвенирование экзона и секвенирование генома обеспечивают наиболее всеобъемлющий подход к генетической диагностике, поскольку многие необходимые ребенку генетические тесты могут быть объединены в одном исследовании. По сравнению с 10–15% диагностической эффективностью традиционного генетического тестирования секвенирование экзона дает возможность установить первичный диагноз у 30–40% пациентов. Несмотря на многообещающие перспективы, применение NGS в педиатрии имеет сложности технического, этического характера, а также связанные с интерпретацией полученных данных. Тем не менее педиатрам необходимо быть готовыми к переходу к геномной диагностике и ее широкому использованию в клинической практике.

### ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES)

- McCandless S.E., Brunger J.W., Cassidy S.B. The burden of genetic disease on inpatient care in a children's hospital. *Am J Hum Genet* 2004; 74(1): 121–127.
- Robin N.H. It does matter: The importance of making the diagnosis of a genetic syndrome. *Curr Opin Pediatr* 2006; 18(6): 595–597. DOI: 10.1097/01.mop.0000247536.78273.78
- Miller D.T., Adam M.P., Aradhya S., Biesecker L.G., Brothman A.R., Carter N.P., Church D.M. et al. Consensus statement: Chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet* 2010; 86(5): 749–764. DOI: 10.1016/j.ajhg.2010.04.006
- Stavropoulos D.J., Merico D., Jobling R., Bowdin S., Monfared N., Thiruvahindrapuram B., Nalpathakalam T. et al. Whole-genome sequencing expands diagnostic utility and improves clinical management in paediatric medicine. *NPJ Genom Med* 2016; 1: 15012. DOI: 10.1038/npjgenmed.2015.12
- Thiffault I., Lantos J. The challenge of analyzing the results of next-generation sequencing in children. *Pediatrics* 2016; 137(Suppl 1): S3–7. DOI: 10.1542/peds.2015-3731C
- Шагам Л.И., Воинова В.Ю. Возможности и ограничения высокопроизводительного секвенирования в диагностике моногенных заболеваний. *Российский вестник перинатологии и педиатрии* 2016; 61(2): 105–109. [Shagam L.I., Voinova V.Yu. High-performance sequencing in the diagnosis of monogenic diseases: Possibilities and limitations. *Rossiyskiy Vestnik Perinatologii i Peditrii* (Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics) 2016; 61(2): 105–109. (in Russ)] DOI: 10.21508/1027-4065-2016-61-2-105-109
- Bowdin S., Gilbert A., Bedoukian E., Carew C., Adam M.P., Belmont J., Bernhardt B. et al. Recommendations for the integration of genomics into clinical practice. *Genet Med* 2016; 18(11): 1075–1084. DOI: 10.1038/gim.2016.17
- UK10K Consortium, Walter K., Min J.L., Huang J., Crooks L., Memari Y., McCarthy S. et al. The UK10K project identifies rare variants in health and disease. *Nature* 2015; 526(7571): 82–90. DOI: 10.1038/nature14962
- Richards S., Aziz N., Bale S., Bick D., Das S., Gastier-Foster J., Grody W.W. et al.; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. 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. DOI: 10.1038/gim.2015.30
- Joshi C., Kolbe D.L., Mansilla M.A., Mason S.O., Smith R.J., Campbell C.A. Reducing the cost of the diagnostic odyssey in early onset epileptic encephalopathies. *Biomed Res Int* 2016; 2016: 6421039. DOI: 10.1155/2016/6421039.
- Warman Chardon J., Beaulieu C., Hartley T., Boycott K.M., Dymont D.A. Axons to exons: The molecular diagnosis of rare neurological diseases by next-generation sequencing. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2015; 15(9): 64. DOI: 10.1007/s11910-015-0584-7.
- Kernohan K.D., Dymont D.A., Pupovac M., Cramer Z., McBride A., Bernard G., Straub I. et al. Matchmaking facilitates the diagnosis of an autosomal-recessive mitochondrial disease caused by biallelic mutation of the tRNA isopentenyltransferase (TRIT1) gene. *Hum Mutat* 2017; 38(5): 511–516. DOI: 10.1002/humu.23196.
- Matchmaker Exchange. <http://www.matchmakerexchange.org/>
- Undiagnosed Disease Network. <https://undiagnosed.hms.harvard.edu/>
- Wenger A.M., Guturu H., Bernstein J.A., Bejerano G. Systematic reanalysis of clinical exome data yields additional diagnoses: Implications for providers. *Genet Med* 2017; 19(2): 209–214. DOI: 10.1038/gim.2016.88.
- Balci T.B., Hartley T., Xi Y., Beaulieu C.L., Bernier F.P., Dupuis L., Horvath G.A. et al. Debunking Occam's razor: Diagnosing multiple genetic diseases in families by whole-exome sequencing. *Clin Genet* 2017; 92(3): 281–289. DOI: 10.1111/cge.12987
- Kalia S.S., Adelman K., Bale S.J., Chung W.K., Eng C., Evans J.P., Herman G.E. et al. Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2016 update (ACMG SF v2.0): a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med* 2017; 19(2): 249–255. DOI: 10.1038/gim.2016.190
- Shahmirzadi L., Chao E.C., Palmaer E., Parra M.C., Tang S., Gonzalez K.D. Patient decisions for disclosure of secondary findings among the first 200 individuals undergoing clinical diagnostic exome sequencing. *Genet Med* 2014; 16(5): 395–399. DOI: 10.1038/gim.2013.153
- Fowler S.A., Saunders C.J., Hoffman M.A. Variation among Consent Forms for Clinical Whole Exome Sequencing. *J Genet Couns* 2018; 27(1): 104–114. DOI: 10.1007/s10897-017-0127-2
- Roche M.I., Berg J.S. Incidental Findings with Genomic Testing: Implications for Genetic Counseling Practice. *Cur-*

- rent Genetic Medicine Reports 2015; 3(4): 166–176. DOI: 10.1007/s40142-015-0075-9
21. Schwarz U.I., Gulilat M., Kim R.B. The Role of Next-Generation Sequencing in Pharmacogenetics and Pharmacogenomics. Cold Spring Harb Perspect Med 2018; pii: a033027. DOI: 10.1101/cshperspect.a033027
  22. PharmGKB. Available at <http://www.pharmgkb.org>.
  23. <https://www.fda.gov/Drugs/ScienceResearch/ucm572698.htm>
  24. Cohn I., Paton T.A., Marshall C.R., Basran R., Stavropoulos D.J., Ray P.N., Monfared N. et al. Genome sequencing as a platform for pharmacogenetic information: A cohort study in children. NPJ Genomic Medicine 2017; 2: 19. DOI: 10.1038/s41525-017-0021-8
  25. Yohe S., Thyagarajan B. Review of Clinical Next-Generation Sequencing. Arch Pathol Lab Med 2017; 141(11): 1544–1557. DOI: 10.5858/arpa.2016-0501-RA
  26. Bell C.J., Dinwiddie D.L., Miller N.A., Hateley S.L., Ganusova E.E., Mudge J., Langley R.J. et al. Carrier testing for severe childhood recessive diseases by next-generation sequencing. Sci Transl Med 2011; 3(65): 65ra4. DOI: 10.1126/scitranslmed.3001756
  27. Cassa C.A., Tong M.Y., Jordan D.M. Large numbers of genetic variants considered to be pathogenic are common in asymptomatic individuals. Hum Mutat 2013; 34(9): 1216–1220. DOI: 10.1002/humu.22375
  28. Gray V.E., Kukurba K.R., Kumar S. Performance of computational tools in evaluating the functional impact of laboratory-induced amino acid mutations. Bioinformatics 2012; 28(16): 2093–2096. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts336
  29. Kankirawatana P., Leonard H., Ellaway C., Scurlock J., Mansour A., Makris C.M., Dure L.S. et al. Early progressive encephalopathy in boys and MECP2 mutations. Neurology 2006; 67(1): 164–166. DOI: 10.1212/01.wnl.0000223318.28938.45

Поступила: 14.11.18

Received on: 2018.11.14

*Источник финансирования:*

*Исследование проведено в рамках финансирования Госзадания «Анализ клинико-генетического полиморфизма инвалидирующих моногенных заболеваний у детей для прогнозирования их течения и определения молекулярных мишеней для оптимизации лечения» АААА-А18-118051790107-2.*

*Конфликт интересов:*

*Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.*

*Source of financing:*

*The study was carried out within the framework of state Funding «Analysis of clinical and genetic polymorphism of disabled monogenic diseases in children to predict their course and identify molecular targets for optimizing treatment» АААА-А18-118051790107-2.*

*Conflict of interest:*

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