

А. С. Рудой

## СТРАТИФИКАЦИЯ КЛИНИЧЕСКОГО РИСКА ПРИ СИНДРОМЕ МАРФАНА: ПЕРСПЕКТИВЫ, ТЕХНОЛОГИИ МАССОВОГО ПАРАЛЛЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Военно-медицинский факультет  
в УО «Белорусский государственный медицинский университет»

---

*Проведен поиск патогенных мутаций и оценка результатов применения высокопроизводительного секвенирования у пациента с клинически установленным диагнозом синдрома Марфана. Наряду с мутацией гена FBN1, отвечающего за развитие жизнеугрожающего состояния – аневризмы и расслоения аорты, выявлены другие варианты замены нуклеотидных последовательностей с неустановленной клинической значимостью. Клиническая интерпретация позволяет судить о возможности их влияния на тяжесть и течение основного заболевания с точки зрения развития других коморбидных заболеваний.*

**Ключевые слова:** массовое параллельное секвенирование, синдром Марфана, мутации, замена нуклеотидной последовательности, ген FBN1.

A. S. Rudoy

## STRATIFICATION OF CLINICAL RISK IN MARFAN SYNDROME: PROSPECTS OF TECHNOLOGY MASS PARALLEL SEQUENCING

*We searched for pathogenic mutations and evaluated the results of using high-performance sequencing in a patient with a clinically established diagnosis of Marfan syndrome. Along with a mutation in gene of FBN1, which responsible for development of a life-threatening condition - aneurysm and aortic dissection, the other variants of replacement of nucleotide sequences of uncertain significance was revealed. Clinical interpretation allows judging the possibility for their influence on the severity and course of the underlying disease from the standpoint of the development of other comorbid diseases.*

**Key words:** massive parallel sequencing, Marfan syndrome, genetic mutation, replacement of the nucleotide sequence, FBN1 gene.

---

Среди известных моногенных заболеваний с вовлечением соединительной ткани наиболее изучен синдром Марфана, в классическом представлении связанный с мутациями в гене фибриллина-1 (*FBN1*) и ассоциированный с высоким риском развития аневризмы аорты и/или острого аортального синдрома.

В клинической практике «классические» фенотипы синдрома Марфана встречаются весьма редко. Чаще в клинической практике приходится сталкиваться с «неклассическим» фенотипом пациента для ассоциированного синдрома, когда в основу тактики ведения этих пациентов ложиться «молекулярно-генетический диагноз». Особенно это характерно для марфаноподобных состояний/фенотипов «Marfan-like» (состояния при которых набор фенотипических признаков не укладывается ни в одно из дифференцированных заболеваний). К примеру, согласно официальному релизу The Human Gene Mutation Database (HGMD) ([http://www.umd.be/FBN1/4DACTION/Protein\\_Domain/57](http://www.umd.be/FBN1/4DACTION/Protein_Domain/57)) на март 2017 года, установлено 203 885 различных мутаций, 2056 из которых приходится на мутации в гене *FBN1*. В этом случае поиск мутации у пробанда может осуществляться только с использованием высокопроизводительного секвенирования. Кроме того, данная технология способствует открытию генетической этиологии недифференцированных форм патологии и существенно облегчает и помогает установить правильный диагноз.

Огромным успехом в этой области исследований и молекулярной медицины пользуется технология массового параллельного секвенирования (MPS; massive parallel sequencing) [1].

Технические возможности высокопроизводительного секвенирования позволяют считывать последовательность одновременно большого числа генов (от сотен миллионов до миллиардов нуклеотидных последовательностей за один рабочий цикл) и выявлять патогенные мутации, ответственные за возникновение генетически гетерогенных заболеваний. Сравнение результатов анализа с референсной последовательностью позволяет выявить практически любые виды мутаций в масштабах всего генома или отдельных его частей. На сегодняшний день метод находит широкое применение в клинической практике. Бурное развитие генетической диагностики предполагает осведомленность врачей-терапевтов о возможностях и ограничениях метода, о выборе стратегии диагностики для каждого конкретного пациента и грамотной интерпретации полученного результата, т.е. о необходимости пациента с позиций персонализированной медицины.

**Цель исследования:** оптимизация подхода при выборе стратегии и тактики лечения при синдроме

Марфана на основании результатов применения высокопроизводительного секвенирования.

**Материалы и методы.** Пациент П., 16 лет, без активных жалоб, обследован на предмет наличия наследственных нарушений соединительной ткани (ННСТ) из-за отягощенной наследственности по матери (в 2012 году перенесла оперативное лечение по поводу расслаивающейся аневризмы аорты с установленным диагнозом синдрома Марфана; отец и сестра здоровы). При медицинском обследовании выявлены признаки системного вовлечения соединительной ткани (СВСТ = 10 баллов), включающие со стороны костно-мышечной системы арахнодактилию (положительный признак запястья (Уолкера) и признак большого пальца (Штайнберга); асимметричную деформацию грудной клетки, сколиоз II степени, нарушение рекурвации в локтевых суставах, лицевые признаки дисморфогенеза (гипоплазия скуловых дуг), долихостеномиелия; со стороны кожи – стрии туловища, со стороны сердечно-сосудистой системы пролапс митрального клапана I степени с нарушением внутрисердечной гемодинамики (регургитация 1 степени) и расширение аорты (Z-критерий – 3,89); со стороны органа зрения сложный близорукий астигматизм и миопия высокой степени, умеренный миопический конус, подвывих хрусталиков обоих глаз. На основании Гентских критериев и инструкции по применению «Метод диагностики синдрома Марфана» [2] достоверно установлен диагноз синдрома Марфана (расширение аорты (Z-критерий  $\geq 3$  и наличие семейного анамнеза синдрома Марфана).

С целью генетического исследования методом массового параллельного секвенирования (MPS) из образца периферической крови была выделена ДНК. Использовали панель генов TruSight® Cardio Sequencing Kit (панель, выявляющая 174 гена, ассоциированных с развитием 17 наследственных заболеваний со стороны сердечно-сосудистой системы). Интерпретация полученных результатов проводилась в Государственном научном учреждении «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси». Оценка клинической значимости (патогенности) выявленных вариантов проводилась на основании российских рекомендаций для интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) [1].

**Результаты и обсуждение.** У пациента П., был проведен поиск патогенных мутаций, ассоциированных с заболеваниями со стороны сердечно-сосудистой системы.

Результаты секвенирования генома пациента представлены в таблице 1. Для оценки популяционных частот выявленных вариантов использовалась выборка проекта «1000 геномов».

Таблица 1. Варианты нуклеотидной последовательности

| Ген            | Хромосома (экзон) | Мутация      | Амино-кислотная замена | dbSNP       | Популяционная частота аллеля* |
|----------------|-------------------|--------------|------------------------|-------------|-------------------------------|
| <i>FBN1</i>    | 15 (62)           | c.7664G > T  | p.G2555V               | -           | -                             |
| <i>ACTN2</i>   | 1 (10)            | c.893G > A** | p.R298H                | rs142482143 | 0,0006                        |
| <i>CRYAB**</i> | 11 (1)            | c.116C > T** | p.P39L                 | rs149787233 | 0,0004                        |

\* – проект 1000 геномов, \*\* – вариант с неустановленной значимостью.

**Клиническая интерпретация.** Все обнаруженные варианты нуклеотидной последовательности необходимо классифицировать по патогенности. Сложность оценки патогенности выявленных вариантов обусловлена большим разнообразием баз данных и включает всесторонне изучение медицинской и научной литературы. Для клинической интерпретации результата MPS необходима его корректная аннотация (описание свойств генетических вариантов), которая обычно включает для каждого изменения ДНК: ген, в котором зафиксирован данный вариант; заболевания, ассоциированные с данным геном с номерами по каталогу OMIM; характеристику выявленных изменений на уровне генома и соответствующих им предполагаемых изменений на уровне генома (молчащая замена, миссенс-, нонсенс-замена, мутация сдвига рамки считывания, мутация сайта сплайсинга и т.п.) и соответствующих им предполагаемых изменений на уровне РНК и белка; популяционную частоту данного генетического варианта. Важно отметить, что оценка патогенности мутации дается на основании общих баз данных HGMD и ClinVar, а также специализированным базам данных различных заболеваний (LOVD и многих других, специфических для каждой группы нозологий). Такие базы данных построены на информации из научных работ, а также неопубликованных данных научных и клинических лабораторий по всему миру. Только на основании вышеупомянутой информации принимается решение о клинической значимости генетического варианта. Следует отметить, что на сегодняшний день основная ценность большинства баз данных генетических вариантов заключается в возможности отбора потенциально патогенных изменений ДНК и ссылок на научную литературу, в которой был описан каждый из выявленных вариантов. Следует отметить, что базы данных ClinVar, включающая описания фенотипов, содержит данные низкого качества, в связи с чем не рекомендуется ее использование при формировании заключений о патогенности выявленного варианта.

Выявлен описанный ранее вариант нуклеотидной последовательности с.G7664T (p.G2555V) в 62 экзоне гена *FBN1*, локализованного на 15 хромосоме. В 62 экзоне гена *FBN1* произошла замена гуанина на тимин в положении 7664 нуклеотидной последовательности, которая ведет к замене глицина на валин в 2555 положении аминокислотной последовательности белка. Выявленный вариант нуклеотидной последовательности не зарегистрирован в контрольных выборках «1000 геномов». Хорошо известно, что мутации в этом гене встречаются у 97 % пациентов с синдромом Марфана. При анализе литературного первоисточника, описывающего данную мутацию [3], было установлено полное совпадение клинико-фенотипических данных пациента. Ген *FBN1* отвечает за синтез, процессинг, секрецию, полимеризацию или устойчивость белка фибриллина-1, который, свя-

зываясь с другими белками, образует микрофибриллы (стенка аорты, цилиарные пояски, кожа и пр.), придает эластичность и сократимость соединительной ткани. Аномалия коллагеноподобного белка фибриллина-1 – важнейшего структурного белка межклеточного матрикса, приводит к нарушению формирования волокнистых структур, потере прочности и упругости соединительной ткани, невозможности выдерживать физиологические нагрузки. Наиболее часто возникает эластоз или разрыв аорты.

При дальнейшем анализе результатов MPS были обнаружены другие замены, имеющие отношение к вероятности развития другой, отличной от основной, гетерогенной патологии. В частности, вторая замена с.C116T (p.P39L), обнаруженная у данного пациента, расположена в 1 экзоне гена *CRYAB*, локализованном на 11 хромосоме. Мутация по каталогу OMIM ответственна за изменение структуры белка  $\alpha$ -В-кристаллина (*CryAB*), который относится к семейству белков теплового шока HSPB5 (heat shock proteins, HSP) и изначально представлял интерес как структурный белок хрусталика глаза. Белок *CryAB* / HSPB5 является составным компонентом у нелентикулярных типов тканей, таких как сердечная и скелетная мускулатура. Отвечает за развитие миофибрилярной  $\alpha$ -В-кристаллин-зависимой миопатии из-за нарушения структурной функции / дезинтеграции Z-диска саркомер мышечных волокон – результата неправильного сворачивания белков, т.е. взаимодействия десмина (белок цитоскелета, участвует в формировании промежуточных филаментов III класса во всех типах мышечной ткани) и мутантного HSPB5 в кардиомиоцитах и скелетных мышцах. Шаперонная функция заключается в обеспечение фолдинга и транслокации белков, предотвращение агрегации белков при воздействии на клетки тепла и/или восстановлении биологической активности клеточных субстратов) и аномального накопления / откладывания данных *CRYAB*-белков в цитоплазме в виде нерастворимых аномальных белковых агрегатов. Клиническая вариативность: выявленная мутация ассоциируется с развитием миофибрилярной альфа-В-кристаллин-зависимой миопатии (группа генетических поражений мышечных тканей разного типа) с мультисистемными проявлениями, как вариант, медленно прогрессирующим течением и возможным развитием внезапной сердечной смерти; изолированной формой катаракты.

Согласно базы данных LOVD (Leiden Open Variation Database) установлено, что эффект данного геномного варианта неизвестен. Анализ интерпретации патогенности мутации согласно баз данных о кодирующей последовательности национального центра биотехнологической информации (NCBI) – ресурса полногеномных референсных последовательностей, со ссылкой на ClinVar, определяет её как *конфликтный вариант патогенности* (вероятно доброкачест-

венная (3 ссылки) и/или вариант неопределенного значения (2 ссылки)). По совокупности проведенного анализа, выявленный вариант нуклеотидной последовательности следует расценивать как *вариант с неопределенной клинической значимостью*, который может иметь отношение к фенотипу пациента в случае получения дополнительных подтверждающих данных.

Третья миссенс мутация с.G893A (p.R298H) была выявлена в 10 экзоне гена ACTN2, локализованного на 1 хромосоме. Данный ген кодирует специфическую для мышц изоформу альфа-актинина, которая выражается как в скелетных, так и в сердечных мышцах. Альфа-актинины относятся к суперсемейству спектрального гена, который представляет собой разнообразную группу цитоскелетных белков, включая альфа- и бета-спектры и дистрофины. Альфа-актинин является актин-связывающим белком с несколькими ролями в разных типах клеток. В мышечных клетках цитоскелетная изоформа встречается вдоль пучков микрофиламентов и соединений типа адгезивов, где она участвует в связывании актина с мембраной. Напротив, скелетные, сердечные и гладкие мышечные изоформы локализуются на Z-образном диске и аналогичных плотных телах, где они помогают закреплять миофибриллярные актиновые филаменты. Для этого гена были найдены несколько вариантов транскрипции, кодирующих различные изоформы. Согласно реферативным источникам, данный вариант представляет собой редкую missense мутацию с *неопределенным воздействием* на функцию белка, ассоциированную с риском развития дилатационной кардиомиопатии [4]. Отмечено, что частота выявления этой замены значительно выше у детей (0–2 года), тогда как у взрослых отмечены лишь единичные случаи. В базе данных ClinVar размещены 2 ссылки, указывающие на *неопределенное значение* и 1 ссылка, которая указывает на вероятную *доброкачественность* данной мутации. Следует отметить, что было бы грубой ошибкой классифицировать генетический вариант как патогенный на основании, только соответствующей записи в базе данных (HGMD, LOVD и пр.) без детального ознакомления с первоисточниками. Кроме того, важную роль в процессе клинической интерпретации играет наличие полной информации о фенотипе больного. Поэтому, особое внимание привлекла другая оценка – оценка частоты соматического варианта в каталоге соматических мутаций при онкопатологиях (COSMIC). Согласно COSMIC отмечается значительная ассоциация – до 39 %, различных вариантов рака (генетический «ландшафт» мутации затрагивает желудочные аденокарциномы, плоскоклеточный рак пищевода и пр.), с установленной мутацией. Следует отметить, что данный каталог не устанавливает причинно-следственную связь. Вместе с тем, у пациента, согласно современных позиций каскада Корея, уже

отмечалось наличие «предраковой перестройки» слизистой оболочки желудка – по результатам биопсии было доказано наличие хронического умеренно выраженного неактивного гастрита с мультифокальной атрофией и метаплазией. При этом, в более ранних работах нами был доказан патогенез данного атрофического гастрита, с позиций причастности найденной у пациента мутации в гене *FBN1*. Данная замена, приводит к синтезу аномального коллагеноподобного белка фибриллина, который приводит к пространственной и временной активации молекулы трансформирующего ростового фактора роста  $\beta 1$  (TGF $\beta$ ), TGF $\beta$ -индукции гастроинтестинальных миофибробластов и дальнейшему патоморфогенезу хронического атрофического гастрита [5]. Наши данные подтверждаются недавними опубликованными результатами Тайваньского популяционного исследования (ноябрь 2017 года), где впервые (!) установлена крайне высокая ассоциация злокачественных новообразований с синдромом Марфана, в частности, с 5-ти и 10-ти кратным риском развития рака желудка и пищевода [6]. Дизайн исследования предполагал изучение общенациональной базы данных здравоохранения о страховании медицинских услуг, охватывая до 99 % тайваньского населения – более чем 2,3 миллионов человек. Таким образом, при наличии еще и замен в генах, ассоциированных с другой (отличной от основной) патологией, необходимо более тщательное наблюдение за пациентом из-за существующего «коморбидного» канцерогенного риска.

Все вышеизложенное приводит нас к пониманию важности проведения ДНК-диагностики у пациентов с синдромом Марфана, для осуществления принципов персонализированной медицины.

### Выводы

1. Технические возможности высокопроизводительного секвенирования позволяют считывать последовательность одновременно большого числа генов и выявлять патогенные мутации, ответственные за возникновение генетически гетерогенных заболеваний.
2. У пациента с синдромом Марфана выявлена диагностически-значимая мутация p.G2555V) в гене *FBN1*, а также две редкие замены в других генах, не ассоциированных с данным заболеванием.
3. Несмотря на то, что выявленные варианты нуклеотидной последовательности имеют неопределенное значения, возможное их отношение к генетической гетерогенности у пациента, ставит вопросы дальнейшего изучения их патогенности.
4. Пример клинического наблюдения еще раз возвращает нас к проблемам дифференциальной диагностики и стратегия долгосрочного наблюдения у пациентов с синдромом Марфана (персонализированной медицины) на основании результатов применения методов генетического обследования.

### Литература

1. Рыжкова О. П. и др. Руководство по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) // Медицинская генетика. – 2017. – Т. 16. – № 7. – С. 4–17.

2. Метод диагностики синдрома Марфана: утв. М-вом здравоохранения Респ.Беларусь 21.07.2016, регистрационный номер № 203–1215/ А. С. Рудой, А. А. Бова, Т. А. Нехайчик, А. М. Урываев; Белорус. гос. мед. ун-т. – Минск, 2016.

3. Comeglio P. et al. The importance of mutation detection in Marfan syndrome and Marfan-related disorders: report of 193 *FBN1* mutations // Human mutation. – 2007. – Т. 28. – № 9. – С. 928–928.

4. Pugh, Trevor J., et al. «The landscape of genetic variation in dilated cardiomyopathy as surveyed by clinical DNA sequencing». Genetics in Medicine 16.8 (2014): 601–608.

5. Рудой А. С., Летковская Т. А., Урываев А. М., Реуцкий И. П. Роль TGF $\beta$ -индукции и гастроинтестинальных миофибробластов в патоморфогенезе хронического гастрита у пациентов с синдромом Марфана и марфаноподобными состояниями // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2016. – № 6. – С. 14–18.

6. Hsu C-W, Wang J-C, Liao W-I, et al. Association between malignancies and Marfan syndrome: a population-based, nested case-control study in Taiwan. BMJ Open 2017;7:e017243. doi:10.1136/bmjopen-2017-017243

Поступила 5.03.2018 г.