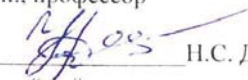


ПРАВИТЕЛЬСТВО МОСКВЫ
ДЕПАРТАМЕНТ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ГОРОДА МОСКВЫ

СОГЛАСОВАНО

Главный внештатный
специалист по медицинской генетике
Департамента здравоохранения
города Москвы
д.м.н., профессор


Н.С. Демикова
« » _____ 2018 г.

РЕКОМЕНДОВАНО

Экспертным советом по науке
Департамента здравоохранения
города Москвы № 18



ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА НАСЛЕДСТВЕННЫХ ФОРМ ЭПИЛЕПСИИ

Методические рекомендации № 110

УДК 616.8-056.76

ББК 56.12

С

Организация-разработчик: Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы "Научно-практический центр специализированной медицинской помощи детям имени В.Ф. Войно-Ясенецкого Департамента здравоохранения города Москвы"
ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России

Составители:

Жилина С.С., Кожанова Т.В., Мещерякова Т.И., Абрамов А.А., Лукаш Е.Н., Осипова К.В., Айвазян С.О., Притыко А. Г., Заваденко Н.Н., Заваденко А.Н.

Рецензенты:

Главный внештатный специалист по медицинской генетике Департамента здравоохранения города Москвы, зав. кафедры медицинской генетики ФГБОУ ДПО Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования МЗ РФ – Наталья Сергеевна Демикова

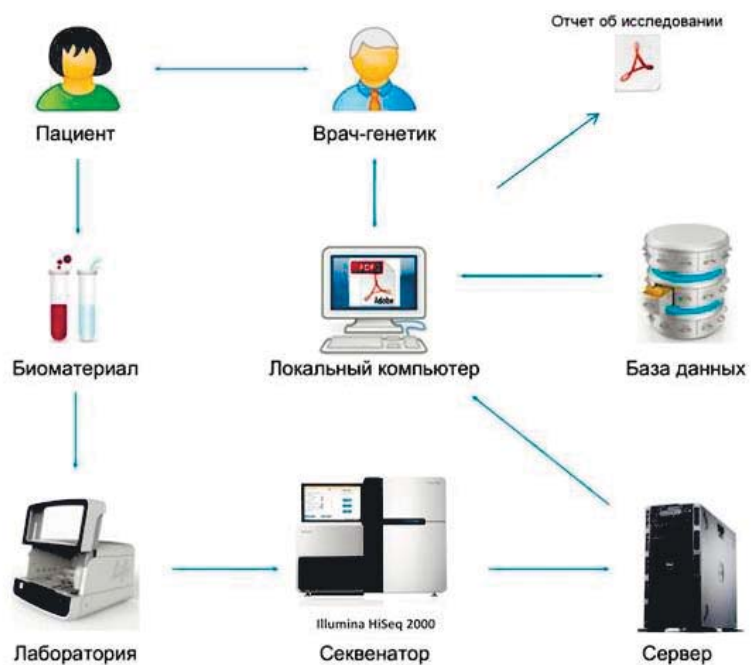
Предназначение: настоящее учебно-методическое пособие предназначено для врачей-генетиков, неврологов, эпилептологов, педиатров, врачей других специальностей, а также обучения ординаторов и студентов медицинских университетов.

Данный документ является собственностью Департамента здравоохранения города Москвы и не подлежит тиражированию и распространению без соответствующего разрешения

ISBN

© Коллектив авторов, 2018

Схема проведения генетического исследования



СОДЕРЖАНИЕ

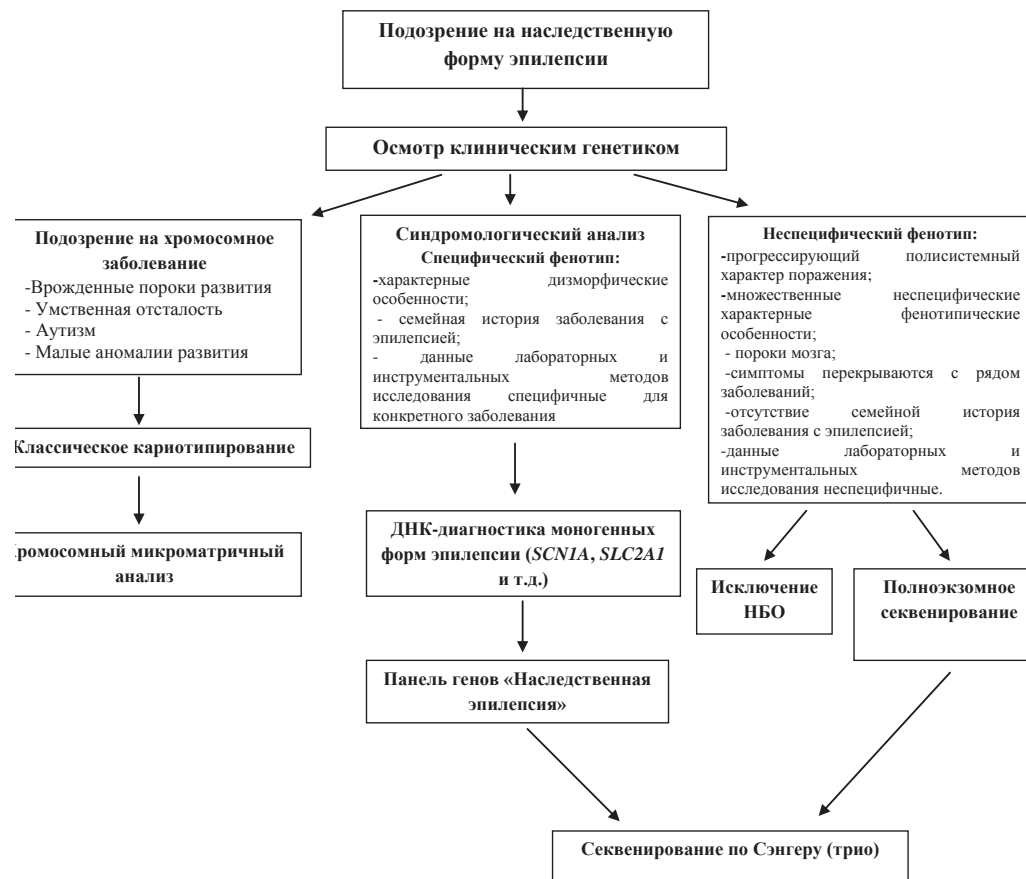
- 1. Нормативные ссылки.....4.
- 2. Определения.....5
- 3. Обозначения и сокращения.....6
- 4. Введение.....7
- 5. Основная часть.....8
- 6. Заключение.....31
- 7. Список использованных источников.....32
- 8. Приложения 1.....37
- 9. Приложения 2.....38.
- 10. Приложения 3.....39.

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

1. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 28 декабря 2000 г. № 457 «О совершенствовании пренатальной диагностики в профилактике наследственных и врожденных заболеваний у детей»;
2. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 15 ноября 2012 г. № 917н "Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи больным с врожденными и (или) наследственными заболеваниями"

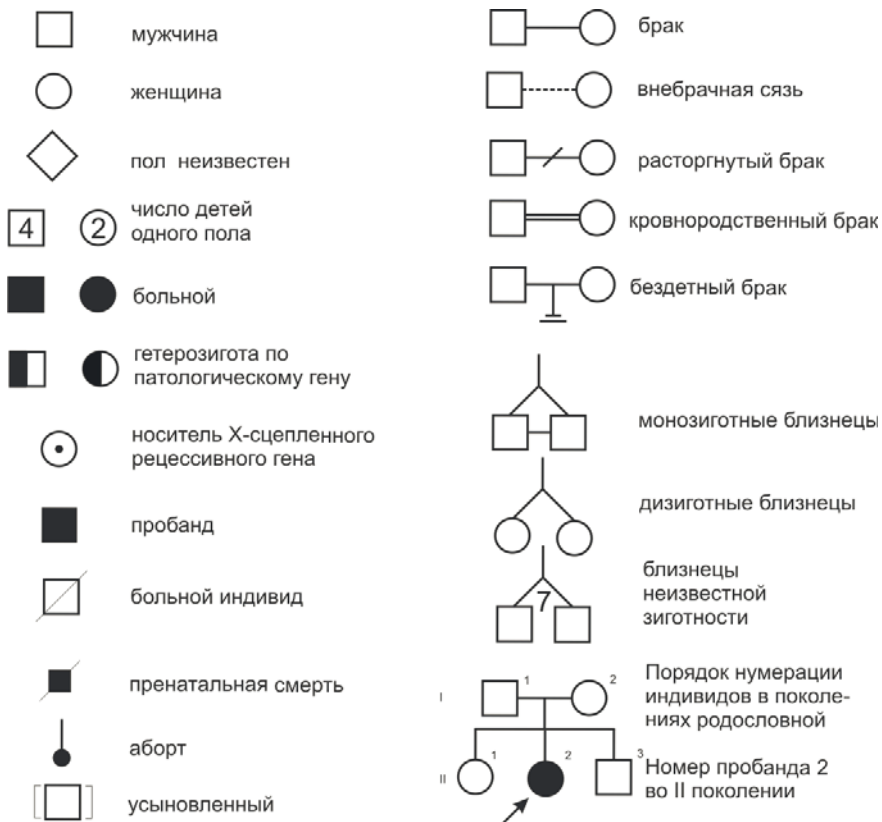
Приложение 2

Алгоритм генетической диагностики наследственных форм эпилепсии



Приложение 3

Символы, используемые при составлении родословной



ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящем документе применяют следующие термины с соответствующими определениями

Вариация числа копий — вид генетического полиморфизма, при котором происходит изменение числа копий определенного сегмента ДНК размером, по крайней мере, 1000 п.н., по сравнению с репрезентативным референсным геномом.

Врожденный порок развития - стойкое морфологическое изменение органа или части тела, выходящее за пределы нормальной вариации их строения, приводящее к нарушению функции или являющееся косметическим дефектом.

Ген - структурная и функциональная единица наследственности живых организмов, представляет собой участок ДНК, задающий последовательность определённого полипептида либо функциональной РНК.

Микроаномалия развития — это такой морфологический дефект, который не влияет на функцию органа.

Мутация — это нарушение структуры, количества наследственного материала и/или его функционирования

Наследственные заболевания — заболевания, возникновение и развитие которых связано с дефектами в наследственном аппарате клеток, передаваемыми по наследству через гаметы.

Секвенирование - метод, который позволяет установить последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК.

Синдромологический анализ - анализ всех фенотипических проявлений больных с целью выявления устойчивого сочетания признаков, характерных для определенных врожденных и наследственных заболеваний.

Эпилепсия - хроническое заболевание головного мозга, характеризующееся повторными, непровоцируемыми приступами нарушений двигательных, чувствительных, вегетативных, мыслительных или психических функций, возникающих вследствие чрезмерных нейронных разрядов.

Эпилептическая энцефалопатия - генетически гетерогенная группа тяжелых расстройств, которые характеризуются наличием судорожного синдрома и сопровождаются выраженными когнитивными и поведенческими нарушениями.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ВПР — врожденные пороки развития
ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
ИЭ — идиопатическая эпилепсия
КТ — компьютерная томография
МАР — микроаномалии развития
МРТ — магнитно-резонансная томография
НБО — наследственные болезни обмена веществ
ПЦР — полимеразная цепная реакция
ПЭП — противосудорожные препараты
УЗИ — ультразвуковое исследование
ХА — хромосомные аномалии
ХМА — хромосомный микроматричный анализ
ЦНС — центральная нервная система
ЭЭ — эпилептическая энцефалопатия
ЭЭГ — электроэнцефалография
ACMG - American College of Medical Genetics and Genomics (Американская коллегия по медицинской генетике и геномике)
CGH — сравнительная геномная гибридизация
CNV — вариации числа копий участков дезоксирибонуклеиновой кислоты
FISH — флуоресцентная гибридизация in situ
NGS — секвенирование нового поколения
OMIM — online каталог генов и генетических заболеваний человека (Online Mendelian Inheritance in Man)

47. Symonds J. D. Advances in epilepsy gene discovery and implications for epilepsy diagnosis and treatment / J. D.Symonds, S. M. Zuberi, M. R. Johnson // *Curr. Opin. Neurol.* – 2017. – Vol. 30. – P. 193–199.
48. Veeramah K. R. Exome sequencing reveals new causal mutations in children with epileptic encephalopathies / K. Veeramah, L. Johnstone, T. Karafet, D. Wolf, R. Sprissler, J. Salogiannis, A. Barth-Maron, M. Greenberg, T. Stuhlmann, S. Weinert, T. Jentsch, M. Pazzi, L. Restifo, D. Talwar, R. Erickson, M. Hammer // *Epilepsia.* – 2013. – Vol. 54. – P. 1270–1281.

ВЕДЕНИЕ

Эпилепсия – одна из распространенных форм неврологической патологии детского возраста. Частота эпилепсии в популяции высока и достигает 0,5-0,75%, а среди детского населения – до 1%. Распространенность фебрильных судорог достигает около 5% среди детей до 6 лет, а в некоторых регионах мира – до 8-14%. У 70% пациентов эпилепсия дебютирует в детском и подростковом возрасте.

Международная лига Комиссии по классификации и терминологии эпилепсии (ILAE) рекомендовала разделение заболевания по этиологии на 3 категории: генетическая, структурная/метаболическая и эпилепсия неуточненной этиологии.

Наиболее интересными с точки зрения генетики являются идиопатические формы эпилепсии (ИЭ), представляющие собой самостоятельные заболевания, не связанные с органическим поражением мозга или другими болезнями. Примерно в 70% случаев ИЭ впервые возникает в детском возрасте. ИЭ традиционно рассматриваются как случаи с высоким риском наследования, о чем свидетельствуют наследственная отягощенность и высокая степень конкордантности среди монозиготных близнецов (65%) по сравнению с дизиготными (12%).

ИЭ является результатом известного или предполагаемого генетического дефекта, при котором приступы - основное ядро патологии. ИЭ может быть вызвана дефектом одного гена (моногенные формы), сложным взаимодействием множественных генов (полигенные формы), которые имеют вариант восприимчивости, или хромосомными aberrациями. Хотя не всегда ясно, какие гены способствуют развитию эпилепсии, наше знание в последние годы о рисках, связанных с определенными генами и хромосомами быстро расширяется, главным образом, в связи с достижениями в области молекулярной генетики.

Эпилептические энцефалопатии (ЭЭ) - генетически гетерогенная группа тяжелых расстройств, которые характеризуются наличием судорожного синдрома и сопровождаются выраженными когнитивными и поведенческими нарушениями. К настоящему времени описано более 50 фенотипических вариантов ранних ЭЭ у детей.

Развитие современных технологий и геномики, а особенно прогресс в прочтении генома человека привели к формированию и быстрому развитию молекулярной медицины, задачами которой являются идентификация структурных и регуляторных генов, выяснение генной природы и молекулярных механизмов многих моногенных и мультифакториальных болезней, роли генетических факторов в этиологии и патогенезе разных патологических состояний.

Одним из наиболее используемых в настоящее время методов поиска корреляций между генотипом и фенотипом является полногеномный поиск ассоциаций. Такие исследования позволяют выявлять в наследственном материале человека генетические различия и искать их взаимосвязь с разными заболеваниями. В настоящее время накоплена информация о миллионах мутаций и полиморфизмах. Но лишь небольшая часть из них является критически важной для возникновения и развития наследственных заболеваний.

Проводятся десятки широкомасштабных полногеномных исследований, направленных на изучение самых разных болезней. Несмотря на существенные достижения в области прочтения генетической информации, до полного ее понимания и возможности проведения полноценных корреляций между генотипом и фенотипом еще далеко.

В настоящее время основные усилия направлены на разработку методов и подходов, позволяющих максимально полно интерпретировать полученную биологическую информацию и связывать ее с клиническими данными.

- Steiner, J. Hansen, C. Courage, S. Gallati, S. Bürki, S. Strozzi, B. Simonetti, S. Grunt, M. Steinlin, M. Alber, M. Wolff, T. Klopstock, E. Prott, R. Lorenz, C. Spaich, S. Rona, M. Lakshminarasimhan, J. Kröll, T. Dorn, G. Krämer, M. Synofzik, F. Becker, Y. Weber, H. Lerche, D. Böhm, S. Biskup // *Epilepsia*. – 2012.– Vol. 53. – P. 1387–1398.
37. Matthijs G. Guidelines for diagnostic next-generation sequencing / E. Souche, M. Alders, A. Corveleyn, S. Eck, I. Feenstra, V. Race, E. Sistermans, M. Sturm, M. Weiss, H. Yntema, E. Bakker, H. Scheffer, P. Bauer // *Eur J Hum Genet*. – 2016. – Vol. 24. – P. 2–5.
38. Nava C. E. De novo mutations in HCN1 cause early infantile epileptic encephalopathy / C. Nava, C. Dalle, A. Rastetter, P. Striano, C. de Kovel, R. Nabbout, C. Cancès, D. Ville, E. Brilstra, G. Gobbi, E. Raffo, D. Bouteiller, Y. Marie, O. Trouillard, A. Robbiano, B. Keren, D. Agher, E. Roze, S. Lesage, A. Nicolas, A. Brice, M. Baulac, C. Vogt, N. El Hajj, E. Schneider, A. Suls, S. Weckhuysen, P. Gormley, A. Lehesjoki, P. De Jonghe, I. Helbig, S. Baulac, F. Zara, B. Koeleman, T. Haaf, E. LeGuern, C. Depienne // *Nat Genet*. – 2014. – Vol. 46. – P. 640–645.
39. Noh G. J. Jr. Clinical review of genetic epileptic encephalopathies / G. J. Noh J. Asher, Y. Graham // *J. Med. Genet*. – 2012. – Vol. 55. – P. 281.
40. Nordli, D. R. Epileptic encephalopathies in infants and children / D. R. Nordli // *J. Clin. Neurophysiol*. – 2012. – Vol. 29. – P. 420–424.
41. Olson H. E. Genetics and genotype-phenotype correlations in early onset epileptic encephalopathy with burst suppression / H. Olson, M. Kelly, C. LaCoursiere, R. Pinsky, D. Tambunan, C. Shain, S. Ramgopal, M. Takeoka, M. Libenson, K. Julich, T. Loddenkemper, E. Marsh, D. Segal, S. Koh, M. Salman, A. Paciorkowski, E. Yang, A. Bergin, B. Sheidley, A. Poduri // *Ann. Neurol*. – 2017. – Vol. 81. – P. 419–429.
42. Richards S. 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 / S. Richards, N. Aziz, S. Bale, D. Bick, S. Das, J. Gastier-Foster, W. Grody, M. Hegde, E. Lyon, E. Spector, K. Voelkerding, H. Rehm; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee // *Genet. Med*. – 2015. – Vol.17. – P. 405–424.
43. Roy S. Standards and Guidelines for Validating Next-Generation Sequencing Bioinformatics Pipelines: A Joint Recommendation of the Association for Molecular Pathology and the College of American Pathologists / C. Coldren, A. Karunamurthy, N. Kip, E. Klee, S. Lincoln, A. Leon, M. Pullambhatla, R. Temple-Smolkin, K. Voelkerding, C. Wang, A. Carter // *J Mol Diagn*. – 2018. – Vol. 20. – P. 4–27.
44. Saitsu H. E. STXBPI mutations in early infantile epileptic encephalopathy with suppression-burst pattern / H. Saitsu, M. Kato, I. Okada, K. Orii, T. Higuchi, H. Hoshino, M. Kubota, H. Arai, T. Tagawa, S. Kimura, A. Sudo, S. Miyama, Y. Takami, T. Watanabe, A. Nishimura, K. Nishiyama, N. Miyake, T. Wada, H. Osaka, N. Kondo, K. Hayasaka, N. Matsumoto // *Epilepsia*. – 2010. – Vol. 51. – P. 2397–2405.
45. Schwarze K. Are whole-exome and whole-genome sequencing approaches cost-effective? A systematic review of the literature / K. Schwarze, J. Buchanan, J. Taylor, S. Wordsworth // *Genet. Med*. – 2018. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.247>.
46. South S. ACMG Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: revision 2013 / S. South, C. Lee, A. Lamb, A. Higgins, H. Kearney; Working Group for the American College of Medical Genetics and Genomics Laboratory Quality Assurance Committee // *Genet Med*. – 2013. – Vol. 15. – P. 901–909.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

I. ОСОБЕННОСТИ ОБСЛЕДОВАНИЯ БОЛЬНЫХ С ПОДОЗРЕНИЕМ НА ГЕНЕТИЧЕСКУЮ ЭПИЛЕПСИЮ

Методика обследования больных состоит из клинического этапа с установлением предварительного диагноза и определения показаний для второго лабораторного этапа диагностики.

На клиническом этапе врач-генетик тщательно собирает анамнез, анализирует генеалогические данные, осматривает пациента с целью выявления малых аномалий и пороков развития, проводит фенотипический и синдромологический анализ и определяет показания для назначения лабораторных и инструментальных методов исследований (КТ, МРТ, УЗИ).

Для определения возможной генетической причины заболевания оправдано использование международных компьютерных баз менделирующих и хромосомных синдромов.

Врач вырабатывает тактику обследования и применяет по показаниям современные цитогенетические, молекулярно-генетические и биохимические методы подтверждающей диагностики.

Первичный прием у врача

На первичном приеме врач проводит сбор данных анамнеза жизни и анамнеза заболевания и их анализ. Необходимо собрать сведения о:

1. Сибсах (братья и сестры), родителей и других родственниках пробанда, как больных так и здоровых, I и II степеней родства;
2. Предыдущих беременностях и родах, периодах новорожденности, вскармливания и раннего развития пробанда;
3. Течении данной беременности: прием лекарственных препаратов, воздействие мутагенных и тератогенных факторов на эмбрион и плод, наличие у супругов вредных привычек и профессиональной вредности;
4. Акушерском анамнезе: наличие токсикозов, угрозы выкидыша, много- или маловодия, преждевременных родов, случаев предшествующего мертворождения или рождения детей с задержкой внутриутробного развития, врожденными пороками развития, хромосомными синдромами, моногенными болезнями и мультифакториальными заболеваниями;
5. Отягощенном гинекологическом анамнезе: инфекции, передаваемые половым путем, хронические соматические заболевания неинфекционной природы.
6. Анамнез заболевания (время дебюта и характер приступов, с оценкой проведенных врачом - эпилептологом обследований (ЭЭГ, МРТ, фармакомониторинг)

Кроме данных о пробанде, врач собирает и анализирует данные о его близких родственниках, имеющих подобное заболевание или частично сходную симптоматику. Если такие родственники выявляются, то они приглашаются для объективного обследования.

Клинико-генеалогический анализ

Клинико-генеалогический анализ основан на данных, полученных у пробанда или его родственников в ходе первичного приема у врача.

Следует обратить внимание на выявление и изучение симптомов заболевания у пробанда, а также у его больных и здоровых родственников. В ходе сбора данных желательно использование семейных фотоальбомов, медицинских архивов и другой документации.

При составлении родословной врач применяет стандартные приемы и символы. Индивид, с которого начинается генеалогическое исследование - это пробанд. Братья и сестры пробанда - это сибсы пробанда (родные, двоюродные, троюродные). Каждый член семейной родословной имеет свой символ (квадрат обозначает мужчину, кружок -

27. EpiPM Consortium. A roadmap for precision medicine in the epilepsies // *Lancet Neurol.* – 2015. – Vol. 14. – P. 1219–1228.
28. Francioli L. C. A framework for the detection of de novo mutations in family-based sequencing data / L. Francioli, M. Cretu-Stancu, K. Garimella, M. Fromer, W. Kloosterman, Genome of the Netherlands consortium, K. Samocha, B. Neale, M. Daly, E. Banks, M. DePristo, P. de Bakker // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2017. – Vol. 25. – P. 227–233.
29. Gaily E. Incidence and outcome of epilepsy syndromes with onset in the first year of life: a retrospective populationbased study / E. Gaily, M. Lommi, R. Lapatto, A. Ehesjoki // *Epilepsia.* – 2016. – Vol. 57. – P. 1594–1601.
30. Gürsoy S., Erçal D. Diagnostic approach to genetic causes of early-onset epileptic encephalopathy / S. Gürsoy, D. Erçal // *J Child Neurol.* – 2016. – Vol. 31. – P. 523–532.
31. Harkin L. A. The spectrum of SCN1A-related infantile epileptic encephalopathies / L. Harkin, J. McMahon, X. Iona, L. Dibbens, J. Pelekanos, S. Zuberi, L. Sadleir, E. Andermann, D. Gill, K. Farrell, M. Connolly, T. Stanley, M. Harbord, F. Andermann, J. Wang, S. Batish, J. Jones, W. Seltzer, A. Gardner, G. Sutherland, S. Berkovic, J. Mulley, I. Scheffer // *Brain.* – 2007. – Vol. 130. – P. 843–852.
32. Kodera H. Targeted capture and sequencing for detection of mutations causing early onset epileptic encephalopathy / H. Kodera, M. Kato, A. Nord, T. Walsh, M. Lee, G. Yamanaka, J. Tohyama, K. Nakamura, E. Nakagawa, T. Ikeda, B. Ben-Zeev, D. Lev, T. Lerman-Sagie, R. Straussberg, S. Tanabe, K. Ueda, M. Amamoto, S. Ohta, Y. Nonoda, K. Nishiyama, Y. Tsurusaki, M. Nakashima, N. Miyake, K. Hayasaka, M. King, N. Matsumoto, H. Saito // *Epilepsia.* – 2013. – Vol. 54. – P. 1262–1269.
33. Kozhanova T.V. The early infantile epileptic encephalopathy associated with mutation in GABRB3 gene / T.V. Kozhanova, S.S. Zhilina, T.I. Mescheryakova, E.G. Lukyanova, E.S. Bolshakova, K.V. Osipova, S.O. Aivazyanyan and A.G. Prityko // *World Journal of Pharmaceutical Research.* - 2018. – Vol. 7. – P. 140-151.
34. Kozhanova T.V. Significance of targeted exome sequencing in the diagnosis of genetic disorders leading to the development of epileptic encephalopathy / T.V. Kozhanova, S.S. Zhilina, T.I. Mescheryakova, T.V. Ananieva, E.G. Luk'yanova, L.M. Sushko, N.P. Prokop`eva, K.V. Osipova, S.O. Aivazyanyan, M.S. Belenikin, N.O. Bruhanova, I.V. Kanivets, F.A. Konovalov, E.R. Tolmacheva, A.G. Prityko // *Journal of bioinformatics and genomics.* - 2017. – Vol. 2. - P. 1-6.
35. Lek M. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans / M. Lek, K. Karczewski, E. Minikel, K. Samocha, E. Banks, T. Fennell, A. O'Donnell-Luria, J. Ware, A. Hill, B. Cummings, T. Tukiainen, D. Birnbaum, J. Kosmicki, L. Duncan, K. Estrada, F. Zhao, J. Zou, E. Pierce-Hoffman, J. Berghout, D. Cooper, N. Deflaux, M. DePristo, J. Do R, Flannick, M. Fromer, L. Gauthier, J. Goldstein, N. Gupta, D. Howrigan, A. Kiezun, M. Kurki, A. Moonshine, P. Natarajan, L. Orozco, G. Peloso, R. Poplin, M. Rivas, V. Ruano-Rubio, S. Rose, D. Ruderfer, K. Shakir, P. Stenson, C. Stevens, B. Thomas, G. Tiao, M. Tusie-Luna, B. Weisburd, H. Won, D. Yu, D. Altshuler, D. Ardissino, M. Boehnke, J. Danesh, S. Donnelly, R. Elosua, J. Florez, S. Gabriel, G. Getz, S. Glatt, C. Hultman, S. Kathiresan, M. Laakso, S. McCarroll, M. McCarthy, D. McGovern, R. McPherson, B. Neale, A. Palotie, S. Purcell, D. Saleheen, J. Scharf, P. Sklar, P. Sullivan, J. Tuomilehto, M. Tsuang, H. Watkins, J. Wilson, M. Daly, D. MacArthur; Exome Aggregation Consortium // *Nature.* – 2016. – Vol. 536. – P. 285–291.
36. Lemke J. R. Targeted next generation sequencing as a diagnostic tool in epileptic disorders / J. Lemke, E. Riesch, T. Scheurenbrand, M. Schubach, C. Wilhelm, I.

13. Козлова С.И. Наследственные синдромы и медико-генетическое консультирование / С.И. Козлова, Н.С. Демикова - Москва: КМК, Авторская академия, 2007. - 448 с.
14. Краснопольская К.Д. Наследственные болезни обмена веществ. Справочное пособие для врачей / К.Д. Краснопольская - Москва: РОО «Центр социальной адаптации и реабилитации детей «Фохат», 2005. - 364 с.
15. Мутовин Г.Р. Признаки и болезни с традиционным и нетрадиционным наследованием / Г.Р. Мутовин, С.С. Жилина, Н.Н. Заваденко, М.С. Беленикин Учебно-методическое пособие – Москва: Специальное издательство медицинских книг, 2015. – С.104.
16. Рыжкова О. П. Руководство по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) / О. П. Рыжкова, О. Л. Кардымон, Е. Б. Прохорчук, Ф. А. Коновалов, А. Б. Масленников, В. А. Степанов, А. А. Афанасьев, Е. В. Заклязьминская, А. А. Костарева, А. Е. Павлов, М. В. Голубенко, А. В. Поляков, С. И. Куцев // Медицинская генетика. - 2017. - Том 16, №7. - С.4-17.
17. Тарасов К.Е. Логика и семиотика диагноза / К.Е. Тарасов, В.К. Веников, А.И. Фролова - Москва: Медицина, 1983. – 272 с.
18. Фогель Ф. Генетика человека / Ф. Фогель, А. Мотульски Москва: Мир, 1989. - 308 с.
19. Allen N. M. Chromosomal microarray in unexplained severe early onset epilepsy—a single centre cohort / N. Allen, J. Conroy, A. Shahwan, S. Ennis, B. Lynch, S. Lynch, M. King // Eur. J. Paediatr. Neurol. – 2015. – Vol. 19. – P. 390–394.
20. Allen N. M. Unexplained early onset epileptic encephalopathy: exome screening and phenotype expansion / N. Allen, J. Conroy, A. Shahwan, B. Lynch, R. Correa, S. Pena, D. McCreary, T. Magalhães, S. Ennis, S. Lynch, M. King // Epilepsia. – 2016. – Vol. 57. – P. 12–17.
21. Berg A. T. Early-life epilepsies and the emerging role of genetic testing / A.T. Berg, J. Coryell, R.P. Saneto, Z.M. Grinspan, J.J. Alexander, M. Kekis, J.E. Sullivan, E.C. Wirrell, R.A. Shellhaas, J.R. Mytinger, W.D. Gaillard, E.H. Kossoff, I.Valencia, K.G. Knupp, C. Wusthoff, C. Keator, W.B. Dobyns, N. Ryan, T. Loddenkemper, C.J. Chu, E.J. Novotny, S. Koh // JAMA Pediatr. - 2017. –Vol. 171. – P. 863–871.
22. Castrén M. Epilepsy caused by CDKL5 mutations / M. Castrén, E. Gaily, C. Tengström, J. Lähdetie, H. Archer, S. Ala-Mello // Eur. J. Paediatr. Neurol. – 2011. – Vol. 15. – P. 65–69.
23. Chu H. Integrated network analysis reveals potentially novel molecular mechanisms and therapeutic targets of refractory epilepsies / H. Chu, P. Sun, J. Yin, G. Liu, Y. Wang, P. Zhao, Y. Zhu, X. Yang, T. Zheng, X. Zhou, W. Jin, C. Sun // PLoS ONE. – 2017. – Vol. 12. – P.e0174964.
24. Deciphering Developmental Disorders Study. Prevalence and architecture of de novo mutations in developmental disorders // Nature. – 2017. – Vol. 542. – P. 433–438.
25. DePristo M. A. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data / M. Pristo, E. Banks, R. Poplin, K. Garimella, J. Maguire, C. Hartl, A. Philippakis, G. del Angel, M. Rivas, M. Hanna, A. McKenna, T. Fennell, A. Kernysky, A. Sivachenko, K. Cibulskis, S. Gabriel, D. Altshuler, M. Daly // Nat. Genet. – 2011. – Vol. 43. – P. 491–498.
26. Dunn P. Next Generation Sequencing Methods for Diagnosis of Epilepsy Syndromes / P. Dunn, C. Albury, N. Maksemous, M. Benton, H. Sutherland, R. Smith, L. Haupt, L. Griffiths // Front Genet. – 2018. – Vol. 9. – P. 20.

женщину) номер, состоящий из двух цифр (римская обозначает номер поколения в родословной, арабская - номер индивида в родословной); нумерация членов одного поколения осуществляется последовательно слева направо. Имеются и другие условные обозначения (символы): аборт, гетерозиготный носитель мутантного гена, моно - и дизиготные близнецы, выкидыш (самопроизвольный аборт), мертворожденный, умерший индивид и т. д. (см. Приложение 1).

Схематическое изображение родословной начинается с пробанда (помечен стрелкой), который обычно располагается в последнем (изучаемом) поколении родственников. Семейная родословная должна охватывать не менее двух-трех поколений родственников. Ограничений в количестве анализируемых поколений нет, и чем больше будет их исследовано, тем достовернее будут выводы.

Далее собираются и обозначаются данные о детях пробанда (если это взрослый человек) и его сибсах (с учетом последовательности беременностей и их исхода). Затем собираются сведения о родственниках по линии матери: сначала все о матери пробанда, ее сибсах и их детях, затем все о бабушке по линии матери, ее сибсах и их детях и внуках. Если возможно, то собираются сведения о прабабушке пробанда. После этого в такой же последовательности собираются сведения о родственниках по линии отца. Под родословной помещается ее легенда - описание существенных для анализа родословной сведений о членах родословной.

Составление легенды к родословной:

1. Паспортная часть;
 - девичья фамилия матери (случаи родственных браков, одинаковые фамилии предков, проживающих в отдаленных населенных пунктах)
2. Возраст;
 - возраст первых клинических проявлений заболевания (приступы)
3. Пол;
4. Национальность;
5. Место жительства семьи;
6. Место жительства предков;
 - выявление кровно-родственных браков в ограниченных отдаленных популяциях людей и этнических группах
7. Профессия;
8. Наличие хронических заболеваний у родственников;

Анамнез жизни и заболевания чрезвычайно важны при диагностике генетических форм эпилепсии.

Анамнез должен собираться подробно, важно получить возможно более точные сведения о течении беременности и родов, периоде новорожденности, вскармливании, раннем развитии. Эти данные позволят предположить тератогенное повреждение, в частности, диабетическую и алкогольную эмбриопатию, фетальный синдром краснухи и т.д. Необходимо сопоставление времени действия выявленного средового фактора с обнаруженным у ребенка симптомокомплексом. Нередко пренатальная гипоплазия является одним из основных признаков наследственного синдрома. При синдромах Дубовица, де Ланге, Смита-Лемли-Опица при доношенной беременности дети рождаются с резко выраженной пренатальной гипоплазией. Напротив, макросомия (средняя масса при рождении — 3900 г, а длина 55,2 см) в сочетании с макроглоссией и омфалоцеле характерна для синдрома Беквита-Видемана. Важны сведения о раннем психомоторном развитии ребенка. Потеря приобретенных навыков — **важный диагностический признак**, который характерен для нейродегенеративных заболеваний. Установление синдромальной формы патологии в периоде новорожденности формирует настороженность врача, осуществляющего медицинское

сопровождение ребенка, в плане появления судорожных приступов, которые квалифицируются как симптоматическая эпилепсия

Возраст манифестации наследственного заболевания может сильно варьировать. Далеко не все наследственные болезни, сопровождающиеся судорогами, проявляются уже при рождении. Это, прежде всего, изолированные пороки развития мозга и синдромы множественных врожденных пороков развития. Необходимо также помнить, что целый ряд изолированных и множественных аномалий развития обусловлены действием средовых (тератогенных) факторов во время беременности и не являются в прямом смысле этого слова наследственными. То есть термины наследственный и врожденный не являются синонимами.

С рождения очевидны 25% моногенных заболеваний, к 3 годам проявляются 70% от всех форм, к концу пубертатного периода — 90%.

Хронический, и нередко прогрессивный характер течения наследственных заболеваний является отражением и следствием стабильности измененного наследственного аппарата клетки, существующей мутации. Например, прогрессивное течение наблюдается при всех наследственных болезнях обмена, при нейродегенеративных заболеваниях (лейкодистрофии, подкорковые дегенерации), эпилептические приступы, в данном случае, симптоматической эпилепсии, как правило, резистентны к антиэпилептическим препаратам.

Лечебные мероприятия при наследственной патологии являются трудным и в некоторых случаях неразрешимым вопросом. Но в то же время разработана тактика медицинского сопровождения и патогенетического лечения больных с доказанными формами редких (орфанных) заболеваний, таких как дефицит биотинидазы, X-сцепленная адренолейкодистрофия, мукополисахаридозы, аминокислотопатии и органические ацидурии.

Накопление в семье больных с одним заболеванием также является одной из характеристик наследственной патологии. В случае моногенных синдромов характер накопления (сегрегация) — по вертикали (у предков и потомков), по горизонтали (у сибсов родных и двоюродных), у лиц только-мужского пола и т.д. соответствует определенному типу наследования. При этом у части родственников в родословной могут присутствовать лишь отдельные симптомы заболевания, что отражает вариабельность экспрессивности генов.

Собранные врачом генетологические данные позволяют определить у пробанда наследственный или ненаследственный характер заболевания (отдельного симптома), тип его наследования (моногенный: аутосомно-доминантный, аутосомно-рецессивный, X-сцепленный доминантный, X-сцепленный рецессивный, Y-сцепленный; полигенный, либо нетрадиционный вариант).

Критерии аутосомно-доминантного типа наследования:

1. Доминантная болезнь проявляется у гетерозигот;
2. Больные есть в каждом поколении;
3. Мужчины и женщины болеют одинаково часто;
4. Вероятность рождения больного ребенка у больного родителя - 50%;
5. У больных родителей гетерозигот (Aa) могут быть здоровые дети (aa);
6. В браке гомозиготы AA со здоровым (aa) — все (100%) дети будут больны (Aa).

Критерии аутосомно-рецессивного типа наследования:

1. Больные дети рождаются у здоровых родителей;
2. У здорового в браке с больным (aa) рождаются здоровые (Aa) гетерозиготные носители гена;
3. Все дети и родители больных являются гетерозиготными носителями патологического гена;
4. У обоих больных родителей все дети будут больны.

Критерии наследования, сцепленного с X-хромосомой (доминантное):

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Абрамов А.А. Исследование мутаций и полиморфизмов в гене SCN1A при идиопатических формах эпилепсии / А.А. Абрамов, Т.В. Кожанова, С.С. Жилина, С.О. Айвазян, Т.В. Ананьева, Т.И. Мещерякова, Н.О. Брюханова, Р.А. Зинченко, Г.Р. Мутовин // Медицинская генетика. - 2015. - Т.14, №2. - С.4.
2. Блиникова О.Е. Семiotика наследственных болезней / О.Е. Блиникова — Москва: Альманах «Исцеление», 2000. - 113 с.
3. Брюханова Н.О. Возможности генетического тестирования при резистентных формах эпилепсии / Н.О. Брюханова, С.С. Жилина, М.С. Беленикин, Г.Р. Мутовин, С.О. Айвазян, А.Г. Притыко // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. - 2015. - Т. 94. № 5. - С. 77-80.
4. Брюханова Н.О. Синдром Айкарди-Гутьерес в группе больных с идиопатической эпилепсией / Н.О. Брюханов, С.С. Жилина, С.О. Айвазян, Т.В. Ананьева, М.С. Беленикин, Т.В. Кожанова, Т.И. Мещерякова, Р.А. Зинченко, Г.Р. Мутовин, Н.Н. Заваденко // Российский вестник перинатологии и педиатрии. - 2016. - № 2. - С.68-75.
5. Жилина С.С. Генетические аспекты и генотип-фенотипические корреляции при редких формах эпилептической энцефалопатии у детей / С.С. Жилина, Т.В. Кожанова, Т.И. Мещерякова, К.В. Осипова, С.О. Айвазян, А.Г. Притыко // Российский вестник перинатологии и педиатрии. — 2017. - №4. - С.169.
6. Иванов В.И. Генетика / В.И. Иванов, Н.В. Барышникова, Дж.С. Билева, Е.Л. Дадали, О.В. Кузнецова, А.В. Поляков. - Москва: Учебник для вузов, ИЦК «Академкнига», 2006. - 603 с.
7. Иванова В.И. Геномика — медицине. Научное издание / В.И.Иванова, Л.Л. Киселев. - Москва: ИЦК «Академкнига, 2005. - 392 с.
8. Кожанова Т.В. Диагностика идиопатических форм эпилепсии у детей на основании алгоритма молекулярно-генетического исследования / Т.В. Кожанова, С.С. Жилина, С.О. Айвазян, Т.В. Ананьева, А.А. Абрамов, М.С. Беленикин, Т.И. Мещерякова, Г.Р. Мутовин, Н.Н. Заваденко // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. — 2016. - №11. - С. 49-56.
9. Кожанова Т.В. Клиническая и молекулярно-генетическая диагностика синдрома дефицита транспортера глюкозы I типа у пациентов психоневрологического отделения / Т.В. Кожанова, С.С. Жилина, Т.И. Мещерякова, С.О. Айвазян, К.В. Осипова, Л.М. Сушко, Е.Г. Лукьянова, Е.А. Пырьева, А.Г. Притыко // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. — 2017. - №1. — С. 156-164.
10. Кожанова Т.В. Синдром дефицита транспортера глюкозы I типа . (GLUT1; болезнь Де Виво): клинические и генетические аспекты / Т.В. Кожанова, С.С. Жилина, Т.И. Мещерякова, С.О. Айвазян, К.В. Осипова, Л.М. Сушко, Е.Г. Лукьянова, Е.А. Пырьева, А.Г. Притыко // Медицинская генетика. - 2016. - №7. — С. 28-32.
11. Кожанова Т.В. Мутация в гене KIAA2022 у девочки с X-сцепленной умственной отсталостью / Т.В. Кожанова, С.С. Жилина, Т.И. Мещерякова, Н.П. Прокопьева, К.В. Осипова, С.О. Айвазян, И.В. Канивец, Ф.А. Коновалов, Е.Р. Толмачева, Ф.А. Кошкин, А.Г. Притыко // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. — 2018. № 1. - С.82-87.
12. Кожанова Т.В. Редкие мутации при эпилептической энцефалопатии у детей: генотип-фенотипические корреляции / Т.В. Кожанова, С.С. Жилина, Т.И. Мещерякова, Т.В. Ананьева, Е.Г. Лукьянова, Л.М. Сушко, Н.П. Прокопьева, С.Л. Карпин, К.В. Осипова, С.О. Айвазян, Н.О. Брюханова, И.В. Канивец, Ф.А. Коновалов, Е.Р. Толмачева, А.Г. Притыко // Quantum satis. — 2017. - №3-4. - С.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При диагностике наследственного заболевания на основании клинико-генеалогических данных определяются показания для проведения подтверждающей генетической диагностики.

Высокопроизводительные методы (NGS, ХМА) все более внедряются в практику практического здравоохранения, однако для их полноценного и экономически обоснованного применения необходимы грамотные дизайн исследования, выбор метода, наиболее подходящего целям исследования - выявления или подтверждения генетической природы идиопатической или симптоматической эпилепсии. Однако наибольшую сложность представляет анализ и интерпретация полученных результатов исследования и заключение, что именно та или иная найденная мутация является причиной заболевания и может объяснить тяжесть его протекания. При увеличении числа генов в патогенезе заболевания и/или при увеличении получаемой в результате высокопроизводительного секвенирования информации, также увеличиваются усилия, необходимые для корректной интерпретации полученных результатов. Необходимо принимать во внимание, что интерпретация результатов проводится на основе информации, присутствующей в научной литературе или биомедицинских базах данных, тогда как значительное число находок никак не охарактеризовано.

Решающее значение в постановке диагноза генетической (моногенной) эпилептической энцефалопатии или эпилепсии при хромосомных аномалиях, нейродегенеративных заболеваниях и наследственных синдромах играют совместные и коллегиальные действия врача-генетика и врача-эпилептолога при гено-фенотипических сопоставлениях.

Причем врач-генетик обязан соблюдать ряд профессиональных требований и правил: принимать самостоятельное решение в выборе методов генетических исследований; помнить, что «последнее слово» в постановке окончательного врачебного диагноза наследственного или врожденного заболевания принадлежит исключительно врачу-генетику; в случае планирования последующего деторождения здорового ребенка в семье консультируемого лица, в которой уже диагностировано моногенное заболевание, врач обязан подтвердить или отвергнуть факт гетерозиготного носительства будущими родителями генов данного заболевания (особенно при тяжелых наследственных болезнях обмена) и только на этой основе делать заключение о прогнозе здоровья потомства.

1. У мужчин проявляется и доминантный и рецессивный ген на X-хромосоме (гемизигота);
2. Заболевание не передается от отца к сыну;
3. Доминантный ген на X-хромосоме проявляется и у мужчин, и у женщин. Передается потомству с вероятностью 50%;
4. При доминантном X-сцепленном типе наследования мужчина передает патологический ген всем дочерям и не передает сыновьям.

Критерии наследования, сцепленного с X-хромосомой (рецессивное):

1. Рecessивный ген на X-хромосоме проявляется у гемизигот-мужчин и не проявляется у женщин-гетерозигот;
2. Женщина-гетерозигота по рецессивному гену (носительница) может передать его с X-хромосомой 50% своих сыновей, которые будут больны.
3. От отца заболевание никогда не передается сыну, а все дочери будут носительницами.

После сбора генеалогических данных врач приступает к объективному осмотру пробанда и его родственников.

Объективный врачебный осмотр

Объективный врачебный осмотр начинается с изучения внешнего вида пробанда и регистрации симптомов или патологических признаков. Правильное выделение и регистрация этих знаков, морфологических и функциональных изменений органов и частей тела, динамики клинических изменений является необходимым условием для успешного распознавания заболевания.

Диагноз многих наследственных синдромов, ассоциированных с эпилепсией, ставится в настоящее время преимущественно с помощью клинических подходов (нейрофиброматоз, туберозный склероз, синдром Айкарди-Гутьереса, синдром Ретта, синдром Ангельмана и т.п.) Внешний вид больных с наследственными болезнями в целом ряде случаев столь характерен, что делает больных более схожими друг с другом, чем с близкими родственниками.

Наследственную патологию характеризует также **множественность, полисистемность поражения**: в патологический процесс вовлечены две, три и более системы организма. При факоматозах это нервная система (фибромы по ходу нервных волокон, судорожные приступы, олигофрения) и кожные покровы (пигментированные и депигментированные пятна, на- и подкожные фибромы). При наследственных болезнях обмена - полисистемность и прогрессивность связана с токсическим или накопительным действием продуктов нарушенного метаболизма. При хромосомных синдромах множественность поражения еще более постоянный симптом, что обусловлено дисбалансом ряда генов, вовлеченных в хромосомную перестройку. Минимальные диагностические критерии синдрома Патау (трисомия по 13 хромосоме): микроцефалия и другие пороки мозга, постаксиальная полидактилия, расщелина губы и неба, поликистоз почек.

Разные системы организма с различной частотой вовлекаются в патологический процесс. По частоте вовлечения в патологический процесс на первом месте стоит нервная система

Генетически обусловленные заболевания отличают также особенности внешнего вида. Под **синдромологическим анализом** подразумевается анализ всех фенотипических проявлений с целью выявления устойчивого сочетания признаков, характерных для определенных врожденных и наследственных заболеваний.

Термин **врожденный порок развития** означает стойкое морфологическое изменение органа или части тела, выходящее за пределы нормальной вариации их строения и приводящее к нарушению функции или являющееся косметическим дефектом. В качестве примера в случаях генетической эпилепсии можно привести

такие пороки развития мозга как фокальная корковая дисплазия, лиссэнцефалия, шизэнцефалия.

В отличие от порока развития **микроаномалия развития** — это такой морфологический дефект, который не расстраивает функционирование органа. Микроаномалии развития широко представлены во всех морфологических структурах человеческого тела, однако, при диагностике наследственных болезней и синдромов преимущественно ориентируются на микроаномалии, регистрируемые при внешнем осмотре пробанда. Регистрация микроаномалий развития у пациента может направить диагностический поиск причин нарушенного психо-неврологического развития и эпилепсии по пути обнаружения микрохромосомных перестроек или моногенных синдромом таких как, например, синдром Миллера-Дикера.

Под **синдромом множественных пороков** развития принято понимать устойчивое сочетание двух или более не индуцируемых друг другом пороков развития в разных системах. Уникальное, описанное только у одного больного сочетание врожденных пороков развития относят к неклассифицированным комплексам пороков развития.

В настоящее время создан ряд удобных и эффективных для пользователя баз данных и экспертных диагностических систем, применяемых для предварительной диагностики моногенных болезней и хромосомных синдромов.

В числе наиболее известных баз данных находятся:

1. Каталог менделирующих признаков человека В. Мак-Кьюсика (OMIM);
2. Лондонская (Оксфордская) медицинская база данных (LMD);
3. ORPHANET;
4. Ряд отечественных систем (Мультимедийная информационно-справочная система "Врожденные пороки развития").

При диагностике наследственного заболевания данные осмотра сопоставляются с клинико-генеалогическими данными, при наличии показаний проводится подтверждающая генетическая диагностика.

Врач-генетик обязан соблюдать ряд профессиональных **требований и правил**:

1. Принимать самостоятельное решение в выборе методов генетических исследований;
2. Всегда помнить, что «последнее слово» в постановке окончательного врачебного диагноза наследственного или врожденного заболевания принадлежит исключительно ему (юридическая обязанность врача), тогда как роль специалиста по лабораторно-генетической диагностике (во многих случаях не врача, а биолога, физиолога или другого профессионала) в решении этого вопроса может быть только вспомогательной;
3. Кроме того, при переходе от лабораторной диагностики к окончательному врачебному диагнозу в случаях моногенного заболевания или хромосомного синдрома, врачу необходимо соблюдать ещё 3 дополнительных правила: соответствие клинических и лабораторных данных; должна учитываться возможность лабораторной ошибки, для избегания которой врач назначает (при малейшем подозрении на неё) проведение повторного лабораторного исследования образца биологического материала, взятого от одного и того же больного;
4. В случае планирования последующего деторождения здорового ребенка в семье консультируемого лица, в которой уже диагностировано моногенное заболевание, врач обязан подтвердить или отвергнуть факт гетерозиготного носительства будущими родителями генов данного заболевания (особенно при тяжелых НБО) и только на этой основе делать заключение о прогнозе здоровья потомства.

Клинические и диагностические критерии для назначения генетического исследования с использованием технологии NGS:

1. Повторяющиеся фебрильно-провоцируемые судороги начинающиеся в возрасте до года или после 6 лет, протекающие с необычной тяжестью течения, в том числе со склонностью статусному характеру приступов;
2. Подозрение по клиническим и лабораторным данным на генетически гетерогенное наследственное заболевание;
3. Выявление природы вероятно генетически обусловленных эпилепсий со схожим фенотипом (например, эпилептические энцефалопатии)
4. Сочетание эпилепсии с врожденными пороками развития, малыми аномалиями развития, задержкой психического развития или расстройствами аутистического спектра.

Для правильной интерпретации результатов генетического тестирования с использованием методов высокопроизводительного секвенирования необходимо тесное взаимодействие врачей, направляющих на генетический анализ и лаборатории. Лаборатория в праве отказать в анализе, если не получает достаточную информацию о фенотипе пациента (результаты клинического обследования, выписка из истории болезни) вместе с биологическим материалом. Лаборатория обязана оценить вариант и ген в контексте анамнеза и семейной истории пациента, физиологического осмотра и предшествующих лабораторных тестов, и при помощи этой информации определить имеет ли вариант нуклеотидной замены отношение к заболеванию, т.е может быть «патогенным», «вероятно патогенным» или «доброкачественным». Рекомендуются проводить исследование трио (мать, отец и ребёнок с заболеванием) в ходе экзомного анализа, особенно при подозрении на рецессивный или *de novo* варианты с целью определения происхождения выявленной мутации.

Данные, полученные методом NGS должны интерпретироваться совместно специалистом (биоинформатиком), врачом-генетиком и врачом другой специальности, который направил пациента на исследование, а не пациентом.

Вариант, классифицированный как «патогенный» при помощи предлагаемой схемы классификации может быть использован врачом для принятия медицинских решений как базовое доказательство. Вариант, классифицированный как «вероятно патогенный», имеет достаточное доказательство для того, чтобы врач смог использовать результаты молекулярного тестирования в принятии клинического решения в сочетании с другими доказательствами по рассматриваемому заболеванию. Вариант «неопределённого значения» не должен быть использован в принятии клинических решений. Вариант, классифицированный как «вероятно доброкачественный», имеет достаточное доказательство для того, чтобы врач заключил, что он не является причиной заболевания у пациента в сочетании с другой информацией. Вариант, приведённый в отчёте как «доброкачественный», имеет достаточную доказательную базу, чтобы врач заключил, что он не является причиной заболевания у пациента.

Общая схема проведения генетического исследования представлена в приложении 3.

II. МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ У ПАЦИЕНТОВ С ПОДОЗРЕНИЕМ НА ГЕНЕТИЧЕСКУЮ ЭПИЛЕПСИЮ

					0	
10	<i>KIAA2022</i>	p.Leu250fs	гемизигота	1(0,7%)	н/д	X-сцепленная умственная отсталость, тип 98 (# 300912)
11	<i>PCDH19</i>	p.Ala517Thr p.Glu189X	гетерозигота гетерозигота	2(1,4%)	0,000011 н/д	Ранняя эпилептическая энцефалопатия, тип 9 (#300088)
12	<i>RNASEH2B</i>	p.Ala287Ser p.Leu138Phe	гетерозигота гетерозигота	2(1,4%)	0,006 0,00025	Айкарди-Гутьереса синдром (#610181)
13	<i>SCN1A</i>	p.Trp153X p.Ser723Pro p.Lys41X p.Leu215Ser p.Ile1754Leu p.Asp382Tyr p.Arg377Pro p.Arg613X Leu1629X	гетерозигота гетерозигота гетерозигота гетерозигота гетерозигота гетерозигота гетерозигота гетерозигота	9 (6,3%)	н/д н/д н/д н/д н/д н/д н/д 0,000406 3 н/д	Ранняя эпилептическая энцефалопатия, тип 6, синдром Драве (#607208) Генерализованная эпилепсия с фебрильными судорогами плюс, тип 2 (#604403)
14	<i>SCN2A</i>	p.Val1287Ileu	гетерозигота	1(0,7%)	н/д	Ранняя эпилептическая энцефалопатия, тип 11 (#613721)
15	<i>SLC2A1</i>	p.Val435fs	гетерозигота	1(0,7%)	н/д	Синдром дефицита транспортера глюкозы 1 типа (#606777)
16	<i>HIVEP2</i>	p.Gln2359Glu	гетерозигота	1(0,7%)	0.000818 6	Умственная отсталость, тип 43 (# 616977)
17	<i>ASH1L</i>	p.Tyr2049Phe	гетерозигота	1(0,7%)	н/д	Умственная отсталость, тип 52 (#617796)
18	<i>ALG13</i>	p.Asn107Ser	гетерозигота	1(0,7%)	н/д	Ранняя эпилептическая энцефалопатия, тип 36 (#300884)
19	<i>IQSEC2</i>	p.Arg898Trp	гетерозигота	1(0,7%)	0.000658 4	X-сцепленная умственная отсталость, тип 78 (#309530)
20	<i>TRIO</i>	p.Pro2493Ala	гетерозигота	1(0,7%)	н/д	Умственная отсталость, тип 44 (#617061)
21	<i>STXBPI</i>	c.429+2T>C	гетерозигота	1(0,7%)	н/д	Ранняя эпилептическая энцефалопатия, тип 4 (#612164)
22	<i>FGF12</i>	p.Thr181Ala p.Arg114His	гетерозигота гетерозигота	2(1,4%)	0.000813 0 н/д	Ранняя эпилептическая энцефалопатия, тип 47 (#617166)
23	<i>EFHC1</i>	p.Thr30Met	гетерозигота	1(0,7%)	0.01342	Ювенильная абсансная эпилепсия (#607631) Ювенильная миоклоническая эпилепсия (#254770)
24	<i>KCNQ2</i>	c.1632-1G>A	гетерозигота	1(0,7%)	н/д	Ранняя эпилептическая энцефалопатия, тип 7 (#613720)
25	<i>CDH15</i>	p.Arg775Gln	гетерозигота	1(0,7%)	0.002079	Умственная отсталость, тип 3 (#612580)
26	<i>MECP2</i>	p.Pro387fs	гетерозигота	1(0,7%)	н/д	Синдром Ретта (# 312750)

Для чего нужна точная генетическая диагностика:

1. Установление диагноза;
2. Определение прогноза для пациента (продолжительность жизни, будет ли прогрессировать, возможность реабилитации);
3. Определение прогноза для членов семьи (возможность рождения здорового ребенка, пренатальная диагностика);
4. Прогноз эффективности лекарственной терапии;
5. Прогноз эффективности хирургического лечения.

Методы аналитической биохимии необходимы для диагностики наследственных болезней обмена, протекающих с резистентными к антиэпилептическим препаратам судорогами.

Объектами лабораторного тестирования больного с наследственной патологией с помощью методов аналитической биохимии являются разные классы органических и неорганических соединений: аминокислоты, углеводы, липиды и их метаболиты, ионы металлов, сульфаты и др. При этом изучаются не только состав, но и концентрация структурных компонентов клеток и тканей, а также изменения активности ферментов, участвующих в их преобразованиях. С помощью методов аналитической биохимии можно исследовать любую биологическую ткань и жидкость человеческого организма. Универсальность этих методов широко используется в определении причин и механизмов наследственных заболеваний.

Постановка точного биохимического диагноза во многих случаях определяет тактику заместительной фармакотерапии.

Методы аналитической биохимии делятся на:

1. **Качественные.** С их помощью определяют избыточную концентрацию субстратов заблокированных ферментных реакций или их производных, накапливающихся при НБО;
2. **Количественные и полуколичественные.** С их помощью определяют изменения концентрации веществ и нарушения кислотно-щелочного равновесия.

Кроме того, различные количественные и полуколичественные методы аналитической биохимии широко применяются для эффективной диагностики НБО. Именно с этой целью была разработана и внедрена в практику здравоохранения развитых стран мира стандартная двухэтапная система обследования больных на основе программ массового (тотального) и селективного (выборочного) скрининга.

Селективный скрининг основан на простых и надежных ориентировочных экспресс-тестах. Но в этом случае могут ещё использоваться специальные методы диагностики наследственных заболеваний в группах пациентов высокого риска по конкретной патологии. К ним относятся: методы исследования метаболического пути, определение количества метаболитов, их кинетики и накопления. Эти методы позволяют определить спектр различных классов органических и неорганических соединений (например, аминокислот) или концентрацию конкретного вещества (например, лейцина или тирозина с помощью флуорометрии).

Критерии для направления на селективный скрининг НБО:

Основные критерии:

- 1) смерть предыдущего ребенка в младенчестве от сходного заболевания
- 2) внезапное ухудшение клинического состояния ребенка после нормальных родов и нормального послеродового периода (часы - недели), не поддающееся терапии и на фоне нормальных результатов рутинного параклинического и лабораторного обследования:

- острая метаболическая энцефалопатия
 - нарушение мышечного тонуса (гипотония/гипертонус)
 - летаргия/кома
 - судороги резистентные к антиэпилептической терапии
 - дистонии, гиперкинезы
 - частые срыгивания/рвота
- 3) гепато/гепатоспленомегалия
4) метаболический ацидоз
5) множественные переломы

Дополнительные критерии:

- 1) Кардиомиопатия
- 2) Гипогликемия
- 3) Тромбоцитопения
- 4) Повышение уровня печеночных ферментов (АлАт, АсАт)
- 5) Повышение уровня креатинфосфокиназы (КФК)
- 6) Снижение уровня щелочной фосфатазы (ЩФ) ниже 60 Ед/л
- 7) Метаболический алкалоз
- 8) Повышение кетоновых тел в крови и/или моче
- 8) Аномальный запах мочи, тела, ушной серы - запах карамели и солода, капустный запах, запах потных ног, любой необычный запах
- 9) Нарушения роста волос, алопеция
- 10) Резистентные к терапии судороги
- 11) Костные аномалии (тугоподвижность суставов, деформация грудной клетки, рахитоподобные изменения)
- 12) Грыжи (пупочная, пахово-мошоночная)

Таким образом, хроматография, масс-спектрометрия, аналитические системы и программные продукты относятся к основным инструментам современных исследований в протеомике.

Молекулярно-генетические и молекулярно-цитогенетические методы исследования в диагностике наследственных форм эпилепсии

В настоящее время появляется все больше сведений о генах, связанных с моногенными формами эпилептической энцефалопатии. Идентификация новых генов и генетических мутаций, способствовало пониманию механизмов некоторых болезней и синдромов. В частности, вклад потенциалзависимых и лигандзависимых ионных каналов в развитие эпилепсии освещен гораздо более подробно.

В последние годы ряд новых молекулярно-генетических технологий стали доступны, и изменили подход к генетическому тестированию эпилепсии, позволяя расширить генетический анализ как спорадических, так и семейных случаев. Две новые крупные технологии: молекулярно-цитогенетический метод анализа вариаций числа копий ДНК (copy number variations - CNV) по сравнению с референсными маркерами, без необходимости культивирования клеток (синонимы: молекулярное карiotипирование, сравнительная геномная гибридизация на чипах, сравнительная геномная гибридизация, молекулярно-цитогенетическое исследование) и секвенирование последующего поколения (next generation sequencing - NGS).

Цитогенетические методы исследования

В клинической генетике с помощью цитогенетических методов проводится обследование пробанда, его больных и здоровых родственников или обследование плода при подозрении на хромосомное нарушение. Цитогенетические методы можно разделить на стандартное карiotипирование, предусматривающее анализ всех хромосом и специальные исследования, при которых анализируются определенные части хромосом.

включены как редкие варианты, так и полиморфизмы с высокой популяционной частотой, ассоциация которых с заболеванием была описана в литературе.

В дальнейшем с усовершенствованием технологии NGS и появлением на рынке более высокопроизводительных секвенаторов (Illumina, USA), расширился спектр выявления мутаций в других генах, ассоциированных с ЭЭ, что связано с возможностью охвата при секвенировании не только отдельных групп генов (более 500 в одной панели), и прочитывания всего экзона ДНК (часть генома, представляющая экзон, то есть последовательности, которые транскрибируются на матричную РНК после того, как интроны удаляются в процессе сплайсинга РНК. Экзом человека содержит приблизительно 180 тысяч экзонов (приблизительно 20000 генов, что соответствует примерно 1% всего генома или 30 миллион пар нуклеотидов). Мутации в экзоне составляют до 85 % от всех мутаций, связанных с болезнями.

С 2017-2018 гг. в ГБУЗ «НПЦ спец.мед.помощи детям ДЗМ» 52 пациента были обследованы с использованием секвенирования панели генов «Наследственная эпилепсия» и полноэкзомного секвенирования на платформе Illumina.

В таблице 3 представлен спектр мутаций в генах, выявленных у пациентов с ЭЭ.

Таблица 3. Мутации в генах, выявленные у пациентов с эпилептической энцефалопатией (N=142)

№	Ген	Мутация	Состояние	n%	Частота аллеля	Заболевание (ОММ)
1	<i>ALDH7A1</i>	p.Arg82X p.Glu399Gln	Компаунд-гетерозигота	1(0,7%)	n/d* n/d	Пиридоксин-зависимая эпилепсия (#266100)
2	<i>CDKL5</i>	p.Tyr286X	гетерозигота	1(0,7%)	n/d	Ранняя эпилептическая энцефалопатия, тип 2 (#300672)
3	<i>CNTNAP2</i>	p.Gly285Ala p.Ile1331X	гетерозигота гетерозигота	2(1,4%)	0,005 n/d	Кортикальная дисплазия – фокальная эпилепсия синдром (#610042) Питт-Хопкинс-подобный тип 1 (#610042)
4	<i>DOCK7</i>	c.1872-8G>T p.Pro2074Leu	гетерозигота гетерозигота	2(1,4%)	n/d 0,009	Ранняя эпилептическая энцефалопатия, тип 23 (#615859)
5	<i>GRIN2B</i>	p.Arg1138Gln p.Arg1241Trp	гетерозигота гетерозигота	2(1,4%)	0,0002 n/d	Ранняя эпилептическая энцефалопатия, тип 27 (#616139)
6	<i>HCN1</i>	p.Ser403Leu	гетерозигота	1(0,7%)	n/d	Ранняя эпилептическая энцефалопатия, тип 24 (#615871)
7	<i>CLCN2</i>	p.Tyr134X	гетерозигота	1(0,7%)	n/d	Ювенильная миоклоническая, абсансная эпилепсия и идиопатическая генерализованная эпилепсия (#607628)
8	<i>SLC25A22</i>	p.Thr171Pro	гетерозигота	1(0,7%)	n/d	Ранняя эпилептическая энцефалопатия, тип 3 (#609304)
9	<i>NRXN1</i>	p.Ile649Val p.Leu748Ile p.Asp5His c.2347+4 T>C	гетерозигота гетерозигота гетерозигота гетерозигота	3(2,1%)	0,0006 0,003 n/d 0,000411	Питт-Хопкинс-подобный тип 2 (#614325)

V. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА РАННИХ ИНФАНТИЛЬНЫХ ЭПИЛЕПТИЧЕСКИХ ЭНЦЕФАЛОПАТИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ NGS

В настоящее время клиническая диагностика ЭЭ не стандартизирована и включает в себя оценку фенотипических проявлений, данные ЭЭГ, КТ, МРТ головного мозга, биохимических исследований и генетическое тестирование начиная от анализа одного гена и заканчивая секвенированием панели генов или полноэкзомным секвенированием. Возрастающая доступность методов высокопроизводительного секвенирования ДНК привела к увеличению числа пациентов с ЭЭ с установленным генетическим диагнозом. На основании данных многочисленных исследований было показано, что окончательный генетический диагноз был получен у ~ 60% пациентов с ЭЭ при использовании комбинации секвенирования панели генов и полноэкзомного секвенирования.

С 2014-2018 гг. в ГБУЗ «НПЦ спец.мед.помощи детям ДЗМ» проведено клинико-генетическое обследование 142 пациентов с клинически-гетерогенными формами эпилепсии, сочетающиеся с эпилептической энцефалопатией и задержкой психомоторного и речевого развития. Проведен фенотипический анализ: характер приступов, когнитивных и поведенческих нарушений, видео-ЭЭГ, МРТ головного мозга и молекулярно-генетические исследования (панель генов «Наследственная эпилепсия», полноэкзомное секвенирование).

Длительное медицинское сопровождение и анализ фенотипа пациентов с резистентной к ПЭП ЭЭ не позволило диагностировать известные моногенные формы эпилепсии. Исходя из этого, были определены показания к проведению таргетного экзомного секвенирования панели генов, ассоциированных с наследственными формами эпилепсии и полноэкзомного секвенирования.

Впервые с момента внедрения технологии высокопроизводительного секвенирования с 2014-2016 гг. в рамках НИР «Внедрение и развитие технологий высокопроизводительного секвенирования для диагностики эпилепсии» Департамента здравоохранения Москвы генетической группой научного отдела ГБУЗ «НПЦ спец.мед.помощи детям ДЗМ» была разработана панель 34 генов (*ARHGFB9, A2BP1, ARX, CDKL5, CNTNAP2, DLGAP2, FOXG1, GABRG2, GRIN2A, GRIN2B, MAPK10, MECP2, NRXN1, PCDH19, PNKP, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, SCN1A, SCN1B, SCN2A, SCN9A, SLC25A22, SLC2A1, SLC4A10, SLC9A6, SPTAN1, STXBPI, SYNGAP1, TCF4, TREX1, UBE3A, ZEB2*), с помощью которой было обследовано 90 пациентов первых лет жизни с ЭЭ, резистентной к ПЭП. Резистентной (некурабельной) называют эпилепсию, при которой тяжесть и частота припадков, неврологические и психологические нарушения или побочные действия ПЭП не поддаются удовлетворительной коррекции и (или) неприемлемы для больного. В развитии резистентности эпилепсии существуют определенные возрастные зависимости, причем один из пиков приходится на младенчество и раннее детство, второй на подростковый и юношеский возраст.

Таргетное экзомное секвенирование панели генов выполнено на анализаторе 454 Sequencing GS Junior (Roche) с использованием олигонуклеотидных зондов NimbleGen. Все этапы пробоподготовки и секвенирования были проведены в соответствии с протоколами производителя оборудования и реагентов (Roche).

В результате проведенного исследования выявлены варианты нуклеотидной последовательности в генах: *CDKL5* (n=4), *CNTNAP2* (n=11), *DLGAP2* (n=11), *GABRG2* (n=4), *GRIN2A* (n=7), *GRIN2B* (n=14), *MAPK10* (n=3), *MECP2* (n=1), *NRXN1* (n=7), *PCDH19* (n=6), *PNKP* (n=4), *RNASEH2A* (n=5), *RNASEH2B* (n=2), *RNASEH2C* (n=2), *SAMHD1* (n=1), *SCN1A* (n=18), *SCN1B* (n=4), *SCN2A* (n=7), *SCN9A* (n=15), *SLC25A22* (n=3), *SLC2A1* (n=6), *SLC4A10* (n=2), *SLC9A6* (n=2), *SPTAN1* (n=10), *STXBPI* (n=4), *SYNGAP1* (n=6), *TCF4* (n=3), *TREX1* (n=2), *UBE3A* (n=3), *ZEB2* (n=2). В список

Классическое кариотипирование основано на анализе морфологии дифференциально окрашенных хромосом, является главным инструментом в изучении кариотипа человека и в диагностике хромосомных болезней. Именно с помощью этого метода выявляется основная доля всех аномалий кариотипа в пре – и постнатальной цитогенетической диагностике, устанавливается баланс или дисбаланс хромосомного материала у пациентов, определяются точки разрывов хромосом при абберрациях.

Однако при анализе сложных случаев хромосомных перестроек, особенно возникших *de novo*, стандартные методы достигают пределов своих разрешающих возможностей. Эту проблему можно решить с использованием современных высокотехнологичных методов изучения хромосомной патологии человека (FISH-метод, хромосомный микроматричный анализ).

FISH-метод диагностики хромосомных нарушений – метод прямого выявления хромосомных микроперестроек непосредственно на цитологических препаратах, позволяющий одновременно исследовать их морфологию (идентифицировать отдельные хромосомы и их участки) с помощью специфических ДНК – зондов. Данный метод позволяет идентифицировать точки разрыва на хромосомах и выявить сбалансированные транслокации.

Хромосомный микроматричный анализ

Хромосомный микроматричный анализ (ХМА) в настоящее время является основным методом диагностики генетической причины множественных врожденных пороков, сопровождающихся эпилептическими приступами и нарушенным психо-неврологическим развитием.

Внедрение технологии ХМА способствовало открытию ранее неизвестных микроделеционных и микродупликационных синдромов, в том числе тех, где одним из клиническим проявлением являются судороги.

Развитие технологии ХМА позволяет врачам оценить весь геном путем анализа вариаций числа копий ДНК (дупликации, делеции) в одном тесте. Высокое разрешение этого метода, однако, ограничивается трудностью определения сбалансированных хромосомных транслокаций или инверсий.

Показание к назначению хромосомного микроматричного анализа в диагностике наследственной эпилепсии:

Сочетание судорожного синдрома с:

1. Врожденными пороками развития;
2. Умственной отсталостью;
3. Аутизмом;
4. Задержкой психомоторного и речевого развития;
5. Малыми аномалиями развития.

Ограничения метода хромосомного микроматричного анализа (что нельзя обнаружить):

1. Сбалансированные хромосомные перестройки (транслокации, инверсии);
2. Точковые мутации;
3. Болезни экспансии тринуклеотидных повторов;
4. Микроделеции/микродупликации, размер которых меньше разрешающей способности микроматрицы.

Определение клинической значимости выявленных вариаций числа копий ДНК методом ХМА с использованием популяционных баз данных и трактовка результатов исследований

1. Трактовке подлежат результаты исследований, прошедших тщательный биоинформатический анализ;
2. Врачу необходимо сопоставить выявленные изменения в геноме с клинической картиной заболевания у пробанда. При необходимости должны быть назначены дополнительные исследования.

Интерпретация данных хромосомного микроматричного анализа проводится согласно рекомендациям ACMG Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: revision 2013; American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants.

1. Патогенные CNV. Вариации числа копий описаны во многих рецензируемых изданиях, базах данных и научной медицинской литературе как причина заболевания с четко установленной клинической значимостью.

2. CNV с неопределенной клинической значимостью – это большая группа включает CNV, которые позже будут описаны либо как исключительно патогенные, либо как доброкачественные. Выделяют три категории для классификации неопределенных вариантов: неопределенная клиническая значимость; вероятно, патогенные, неопределенная клиническая значимость; вероятно, доброкачественные, неопределенная клиническая значимость (нет подклассификации).

3. Доброкачественные CNV. Вариации числа копий, описанные во многих рецензируемых изданиях или базах данных как доброкачественный вариант, особенно если вариация числа копий была хорошо охарактеризована и/или CNV представляет собой частый полиморфизм. CNV квалифицируется как полиморфизм, если она зарегистрирована у 1% в общей популяции.

Базы данных, используемые для интерпретации результатов ХМА: OMIM, ISCA, DECIPHER, GeneReviews, Database of genomic variants, PubMed.

Молекулярно-генетическая диагностика **синдрома Ангельмана**, при клиническом проявлении которого могут наблюдаться судороги возможна только при использовании методики, которая основана на существенном различии метилирования некоторых генов на отцовской и материнской хромосоме (анализ аллельного метилирования методом метил-специфическая ПЦР) и **синдрома Мартина-Белл** (определение аномального метилирования методом метилчувствительной ПЦР промоторной области гена *FMRI*).

Секвенирование последующего поколения - next generation sequencing - NGS

Высокопроизводительное секвенирование представляет собой мощный и получающий все большее распространение инструмент для изучения наследственных заболеваний, в т.ч. эпилепсии. Преимуществом, но одновременно и трудностью этого метода является генерация избыточного количества информации, которую необходимо интерпретировать в соответствии с клиническими данными. Вовлеченность в патогенез эпилепсии большого числа генов, а также разнообразие эпилептических синдромов значительно усложняет такую интерпретацию. Лишь в части случаев эпилепсия вызвана мутацией в конкретном одиночном гене (и чаще всего это ионные каналы). Технология массового параллельного секвенирования (NGS) — техника определения нуклеотидной последовательности ДНК и РНК для идентификации их первичной структуры. Технология NGS позволяет «прочитать» одновременно сразу несколько участков генома, что является главным отличием от более ранних методов секвенирования. В ходе NGS могут генерироваться от сотен миллионов до миллиардов нуклеотидных последовательностей за один рабочий цикл.

В настоящее время для высокопроизводительного секвенирования доступны несколько платформ: HiSeq, MiSeq и NextSeq 500 (Illumina), Ion torrent (Thermo Fisher Scientific) и SOLiD (Applied Biosystems). В самых общих чертах эти платформы работают по аналогичному процессу, который включает: (а) подготовку мишени путем разбивания больших макромолекулы ДНК, чтобы создать библиотеку из коротких фрагментов со синтетическими ДНК адаптерами на концах фрагмента, (б) массивную и параллельную клональную амплификацию индивидуальных фрагментов молекул ДНК на предметном стекле или микрошариках с помощью ПЦР, чтобы генерировать достаточное количество копий меченного фрагмента, которое нужно будет определить

Таблица 2. Результаты клинического и молекулярно-генетического тестирования пациентов с синдромом дефицита GLUT1

Признак	Наличие признаков у пациентов					
	Пациент 1	Пациент 2	Пациент 3	Пациент 4	Пациент 5	Пациент 6
Пол	девочка	девочка	мальчик	мальчик	мальчик	мальчик
Возраст на момент осмотра	6 лет 9 мес	3 года 3 мес	9 лет 9 мес	4 года	5 лет	3 года 8 мес
Начало приступов	6 мес	1,5 мес	1,5 года	1 год 2 мес	1,5 года	11 мес
Тип приступов	Медленные кивки, прикрывание век, абсансы	Пароксизмальные эпизоды в виде прерывистого дыхания, замираний, стереотипных вращательных движений глазных яблок, миоклонус	Эпизоды падений, вздрагивание, кивки головой	Тонико-клонические приступы	Утрата сознания, деуринация, поворот головы вправо, правосторонние гемиклонии.	Наклоны головы, длительная атака «скручивание всего тела» без потери сознания, миоклонии
Психомоторная задержка	+	+	+	+	+	+
Нарушение речи	-	+	+	+	+	+
Микроцефалия	-	+	-	-	-	-
Атаксия	-	+	-	-	+	+
Спастичность	-	+	-	-	-	-
Альтернирующая гемиплегия	-	+	-	-	+	+
Уровень глюкозы в СМЖ	1,8 ммоль/л	Н.д.	1,7 ммоль/л	2,0 ммоль/л	1,3 ммоль/л	1,7 ммоль/л
Длительность кетогенной диеты	3 года	1 год	3 года	2,5 мес.	1 мес	В плане
Эффективность кетогенной диеты	Отсутствие приступов, улучшение психомоторного развития	Отсутствие приступов, улучшение психомоторного развития, дискоординация, дизартрия	Отсутствие приступов, улучшение психомоторного развития	Отсутствие приступов, улучшение психомоторного развития, дизартрия	Н.д.	Н.д.
Мутация в гене <i>SLC2A1</i>	c.1305-1306insTGAA GA (p.V435VF1)	c.115-2A>G (IV S2-2A-G)	c.101A>G (p.Asn34Ser)	c.400G>A (p.Gly134Ser)	рекомендовано	рекомендовано

оптической системой машины, и (в) секвенирование при помощи нескольких циклов, которые повторяются и определяются автоматически, чтобы создать короткие прочтения. Данные этих прочтений затем собираются с помощью устройства, выравниваются с помощью специального программного обеспечения, что позволяет восстановить исходную последовательность мишени.

Технологии NGS активно внедряется в область эпилептологии в качестве диагностического теста. В настоящее время известно более 500 генов, мутации в которых могут быть причиной развития эпилепсии. Большое число идентифицированных генов, ассоциированных с эпилепсией, затрудняет использование конкретного моногенного теста для выявления причины заболевания у пациентов с несиндромальной или идиопатической эпилепсией. NGS меняет эту ситуацию, исследуя при тестировании клинически значимые гены в рамках отдельной панели и/или все белок-кодирующие участки генома (полноэкзомное секвенирование).

Секвенирование панели генов эпилепсии

В диагностическую панель собраны ряд известных генов, которые уже были идентифицированы как причины конкретных заболеваний. Быстро развивающиеся технологии экзомного или полногеномного секвенирования, позволят выявлять новые нуклеотидные замены, как во вновь описанных генах, так и в уже известных генах при клинических формах эпилепсии. Это быстро накапливаемая генетическая информация расширит наше знание об эпилепсии, и позволит более рационально и эффективно использовать арсенал противоэпилептических препаратов. Однако, наряду с возможностью идентифицировать генетические варианты, потенциально связанные с эпилепсией, крайне важно проверять генетические ассоциации и анализировать их клиническое значение.

Панель «Наследственные эпилепсии»

1. Анализ более 500 генов, связанных с различными формами эпилепсий методом секвенирования нового поколения;
2. Улучшенный биоинформатический алгоритм;
3. Высокая диагностическая эффективность;

Необходимость проведения данного исследования:

1. Установление точного диагноза;
2. Возможность предсказания дальнейшего развития эпилепсии;
3. Выбор наиболее эффективной терапии;
4. Определение риска наследственного заболевания для будущего потомства неотъемлемая часть планирования беременности.

Показания к проведению исследования:

1. Отягощенная наследственность по эпилепсии;
2. Фебрильные судороги начинаются в возрасте до года или после 6 лет. Протекают с необычной тяжестью течения, в том числе может быть статусный характер приступов;
3. Подозрение по клиническим и лабораторным данным на моногенную генетическую эпилепсию;
4. Исключение нескольких генетически обусловленных эпилепсий со схожим фенотипом (например, эпилептические энцефалопатии);
5. Сочетание эпилепсии с врожденными пороками развития, малыми аномалиями развития, задержкой психического развития или расстройствами аутистического спектра.

Полное секвенирование экзома

Секвенирование экзома (Exome sequencing) – секвенирование всех кодирующих белки участков генов (экзонов). Экзом (180000 экзонов или приблизительно 30 млн. пар оснований) составляет около 1% генома человека, но мутации в нем имеют гораздо больше шансов вызывать серьезные последствия, чем в остальных 99%.

Преимущества обследования методом полноэкзомного секвенирования:

1. Идентификация новых редких мутаций;
2. Идентификация новых синдромов;

Ограничения метода NGS (что нельзя обнаружить):

1. Мутации, приводящие к изменению числа копий генов;
2. Экспансию тринуклеотидных повторов;
3. Мутации в генах митохондриального генома;
4. Однородительские дисомии;
5. Различить мутации в гене и псевдогене (например, при спинальной амиотрофии).

Определение клинической значимости выявленных вариантов нуклеотидной последовательности ДНК методом NGS с использованием пополняемых баз данных и трактовка результатов исследований

1. Трактовке подлежат результаты исследований, прошедших тщательный биоинформатический анализ;
2. Врачу необходимо сопоставить выявленные изменения в геноме с клинической картиной заболевания у пробанда. При необходимости должны быть назначены дополнительные исследования;
3. Проверить наличие выбранных врачом генов, которые могут приводить к заболеваниям и проверить наличие выявленных мутаций у пробанда и его родителей секвенированием по Сэнгеру.

Интерпретация данных полученных методом NGS проводится согласно рекомендациям - ACMG 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; Guidelines for diagnostic next-generation sequencing; Standards and Guidelines for Validating Next-Generation Sequencing Bioinformatics Pipelines: A Joint Recommendation of the Association for Molecular Pathology and the College of American Pathologists; Руководство по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования.

Выявленные варианты классифицируются на 6 классов на основании стандартов и рекомендаций ACMG:

Класс 1 – патогенные

Класс 2 – вероятно патогенные

Класс 3 – варианты с неопределенной клинической значимостью

Класс 4 – вероятно доброкачественные

Класс 5 – доброкачественные

Класс 6 – варианты, ассоциированные с заболеванием.

Базы данных, используемые для интерпретации результатов NGS:

1. Базы данных болезней и клинической значимости мутаций: OMIM, ClinVar, Orphanet, а также специализированные базы данных по отдельным заболеваниям и литературные данные;
2. Сервисы предсказания патогенности: Polyphen2, SIFT, MutationTaster, PROVEAN;
3. Базы данных популяционных частот выявленных вариантов - «1000 геномов», Exome Aggregation Consortium и Genome Aggregation Database.

Все варианты нуклеотидной последовательности ДНК, выявленные методом NGS и указанные в заключении лаборатории о проведенном анализе, должны быть подтверждены референсным методом (секвенирование по Сэнгеру), а также должно быть исследовано происхождение мутации (унаследована от родителей или возникла *de novo*) – секвенирование по Сэнгеру трио.

4. Двигательные расстройства, включая атаксию, альтернирующую гемиплегию, гиперкинезы по типу дистонии и хорей;
5. Симптомы провоцируются физической нагрузкой, голодом или увеличением промежутков между приемами пищи с некоторым улучшением состояния после еды;
6. Низкая концентрации глюкозы в спинномозговой жидкости (норма 2,2-3,3 ммоль/л) при нормальных показателях глюкозы в крови.

В психоневрологическом отделении ГБУЗ «Научно-практический центр специализированной медицинской помощи детям имени В.Ф. Войно-Ясенецкого ДЗМ» наблюдаются 6 пациентов с подтвержденным синдромом дефицита транспортера глюкозы I типа (болезнь де Виво), ассоциированного с мутациями в гене *SLC2A1*. Результаты клинического и молекулярно-генетического тестирования пациентов представлены в таблице 2.

В настоящее время кетогенная диета является весьма эффективным методом терапии в уменьшении проявления клинических симптомов синдрома дефицита GLUT1 (в первую очередь, судорожного синдрома и двигательных расстройств). Кетонные тела проникают через гематоэнцефалический барьер посредством другого белка – транспортера и, таким образом, обеспечивают мозг необходимым количеством энергии для метаболизма. Кетогенная диета, как правило, хорошо переносится пациентами. Прогноз благоприятный, если кетогенная диета начинается в раннем детстве.

Судорожный синдром. Приступы при ранней классической форме синдрома дефицита GLUT1, которые обычно начинаются в возрасте одного - шести месяцев, часто являются первым клиническим признаком дисфункции мозга. У некоторых детей, начав судорожного синдрома могут предшествовать эпизоды апноэ и аномальные движения глазных яблок, неотличимые от опсоклонуса. Инфантильные очаговые судороги может включать в себя пароксизмальные движения глаз, а также абсансы и атонические приступы. Электроэнцефалограмма (ЭЭГ) показывает мультифокальные спайк разряды. При дальнейшем созревании мозга, приступы становятся синхронизированными и клинически манифестируют как генерализованные. Описаны несколько типов судорог: генерализованные тонические или клонические, фокальные, миоклонические, атипичные абсансы, атонические и неклассифицируемые.

Частота приступов среди пациентов варьирует от ежедневных до приступов, которые наблюдаются раз в несколько дней, недель или месяцев и не коррелирует с тяжестью других признаков фенотипа.

Интеллектуальные нарушения. У всех пациентов наблюдается нарушения речи. Когнитивные нарушения варьируют от снижения обучаемости ребенка до тяжелой умственной отсталости. Социальное адаптивное поведение сохранено. Пациенты с синдромом дефицита GLUT1, как правило, хорошо приспособляются к обществу и контактируют с другими людьми.

Двигательные расстройства. Двигательные нарушения при синдроме дефицита GLUT1 представлены атаксией, дистонией, хореей, и могут быть постоянными или пароксизмальными. Основными провоцирующими факторами являются увеличение промежутков между приемами пищи, психотравмирующие ситуации или инфекции. Пароксизмальная дискинезия с эпилепсией (ранее известная как дистония тип I и пароксизмальный хореоатетоз со спастичностью (ранее известный как дистония тип 9 в настоящее время рассматриваются как часть фенотипического спектра синдрома дефицита GLUT1).

Ген *SLC2A1* - единственный ген, патогенные варианты в котором, как известно, вызывают синдром дефицита GLUT1. Ген *SLC2A1*, кодирующий белок GLUT-1, состоит из 10 экзонов и 9 интронов, локализуется на коротком плече 1 хромосомы (1p34.2). Описано более 150 мутаций в гене *SLC2A1*, являющиеся причиной синдрома дефицита GLUT1. Патогенные варианты представлены миссенс-мутациями, nonsense-мутациями, могут включать небольшие внутригенные делеции/инсерции, а также вариантами сайтов сплайсинга (табл.1). В большинстве случаев заболевание связано с *de novo* мутациями в гене *SLC2A1*. В части случаев синдром дефицита GLUT1 – заболевание с аутосомно-доминантным типом наследования, при котором пораженный родитель (носитель патогенной мутации в гене *SLC2A1*) может иметь легкую форму заболевания.

Таблица 1. Частота выявления различных типов патогенных вариантов в гене *SLC2A1*

Ген	Метод исследования	Доля пациентов с патогенными вариантами
<i>SLC2A1</i>	Секвенирование гена	48/54 (89%)
	Анализ делеций/дупликаций	6/54 (11%)

Клинические и диагностические критерии для направления на исследование мутации в гене *SLC2A1*:

1. Начало судороги в возрасте от 1 до 6 месяцев;
2. Задержка психомоторного развития, дизартрия;
3. Приобретенная микроцефалия;

III. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА *SCN1A*-АССОЦИИРОВАННЫХ ЭПИЛЕПСИЙ

На основании данных, полученных при молекулярно-генетических исследованиях семей, страдающих различными формами генетической эпилепсии, а также принимая во внимание современные представления о патофизиологических механизмах, можно выделить следующие группы генов, участвующих в ее развитии: гены потенциал-зависимых ионных каналов (натриевый, кальциевый, хлорный, калиевый); гены рецепторов и переносчиков нейромедиаторов торможения и возбуждения (гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), серотонина, глутамата) и др.

Гены потенциал-зависимых натриевых каналов являются важной группой генов, принимающих участие в развитии генетической эпилепсии. Кроме того, многие противоэпилептические препараты оказывают свое действие путем ингибирования активности этих каналов. Мутации в генах *SCN1A*, *SCN2A* и *SCN1B* вовлечены в патогенез генерализованной эпилепсии с фебрильными судорогами плюс (ГЭФС+, OMI: #604233) и тяжелой миоклонической эпилепсии новорожденных (ТМЭН, OMI: #607208). Мутации в гене *SCN1A* встречаются в 10-20 % случаев ГЭФС+ и 80-90% случаев синдрома Драве.

На сегодняшний день не описано каких-либо корреляций между фенотипом и генотипом при *SCN1A*-ассоциированных эпилепсиях. Однако показано, что мутации, приводящие к терминации синтеза белка, ассоциированы с более тяжелым фенотипом эпилепсии.

В последние годы значительно расширился спектр идентифицированных детских эпилептических энцефалопатий, ассоциированных с мутациями в гене *SCN1A*. Сюда включены криптогенная фокальная и генерализованная эпилепсия, синдром Дузе (миоклонически-астатическая эпилепсия), синдром Леннокса-Гастро и, так называемая, вакцин-ассоциированная энцефалопатия.

Синдром Драве - тяжелая миоклоническая эпилептическая энцефалопатия с дебютом на первом году жизни, проявляющаяся фебрильными и афебрильными генерализованными и фокальными приступами с наличием миоклонических пароксизмов в типичных случаях, отставанием в психическом развитии и резистентностью к антиэпилептической терапии. Впервые была описана Ch. Dravet в 1978 году как тяжелая миоклоническая эпилепсия младенчества. Распространенность – 1:20000-1:40000 населения; аутосомно-доминантное наследование с неполной пенетрантностью (70-80%); По крайней мере 25% пациентов с синдромом Драве имеют отягощенный семейный анамнез в отношении эпилепсии или фебрильных судорог. Данное заболевание характеризуется появлением приступов на первом году жизни; провоцирующие факторы - закрытие глаз или прерывистая фотостимуляция; задержкой психомоторного развития со 2 года жизни; наличием генерализованных или парциальных фебрильных судорог, которые развиваются вслед за афебрильными судорогами, включая миоклонические, абсансные, тонико-клонические и парциальные приступы. В 95% случаев при синдроме Драве обнаруживаются *de novo* мутации в гене *SCN1A*.

Генерализованная эпилепсия с фебрильными судорогами плюс (ГЭФС+) - наследуется по аутосомно-доминантному типу с неполной пенетрантностью. Причина развития заболевания — возникновение мутаций в генах *SCN1A*, *SCN2A*, *SCN1B*, *GABRG2*. Проявление заболевания приходится на первые годы жизни ребенка. Точный возраст обозначить сложно, так как он значительно варьирует — от 4 месяцев до 6 лет. Основным симптомом являются продолжительные тонико-клонические судороги. При этом выделяют ряд специфических особенностей, которые характерны именно для генерализованной эпилепсии с фебрильными судорогами плюс: отсутствие неврологических заболеваний; судороги могут возникать на фоне повышения температуры тела или без нее; отсутствие задержки психического, физического или

умственного развития; возможно сочетание с миоклониями, абсансами, фокальными приступами. Судороги самостоятельно прекращаются по мере взросления ребенка. Средний возраст ремиссии составляет 10–11 лет. Так как при генерализованной эпилепсии с фебрильными судорогами плюс не страдает интеллект и психомоторное развитие, то заболевание протекает относительно легко и характеризуется благоприятным прогнозом.

Ген *SCN1A* кодирует $\alpha 1$ субъединицу нейронального потенциалзависимого натриевого канала (OMIM:182389), локализуется на длинном плече 2 хромосомы (2q24.3), размер белок-кодирующей части – 6030 пар нуклеотидов (включает 26 экзонов). В настоящее время известно более 1000 мутаций в *SCN1A* гене, которые распределены равномерно по всем экзонам гена (рис.1).



Рисунок 1. Типы мутаций в гене *SCN1A*

Так для подтверждения *SCN1A*-ассоциированных эпилепсий используют прямое секвенирование отдельных экзонов *SCN1A* гена.

Клинические и диагностические критерии для направления на молекулярно-генетическое исследование с целью поиска мутаций в гене *SCN1A* методом прямого секвенирования по Сенгеру:

1. Дебют фебрильных генерализованных и фокальных приступов с наличием миоклоний на 1 году жизни;
2. Характерна высокая частота приступов, их серийное и склонность к статусному течению;
3. Провоцирующие факторы возникновения приступов - лихорадка, внешнее перегревание (горячая ванная, интенсивная физическая нагрузка, высокая температура окружающей среды);
4. Неврологическое обследование выявляет нарушения у большинства пациентов: мышечная гипотония, атаксия, интенционный тремор, моторная неловкость, признаки пирамидной недостаточности. Обязательный признак заболевания – присоединение (обычно после 4 лет) неэпилептического миоклонуса, усиливающегося при выполнении произвольных движений, который с возрастом нарастает;
5. Задержка психического и речевого развития разной степени выраженности;
6. Характерная особенность ЭЭГ в межприступном периоде – сочетание региональной, мультирегиональной и диффузной эпилептиформной активности с нарастанием во сне.

С 2010-2018 гг. в ГБУЗ «НПЦ спец.мед.помощи детям ДЗМ» проведено молекулярно-генетическое исследование гена *SCN1A* у 220 пациентов. При обнаружении у больного мутации в гене *SCN1A*, обследование с целью определения происхождения найденного варианта проводилось у родителей.

При прямом секвенировании по Сенгеру экзонов гена *SCN1A* у 220 пациентов выявлено 35 (15,9%) мутаций.

IV. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА СИНДРОМА ДЕФИЦИТА ТРАНСПОРТЕРА ГЛЮКОЗЫ ПЕРВОГО ТИПА (БОЛЕЗНЬ ДЕ ВИВО; OMIM # 606777)

Транспорт водорастворимых молекул через тканевые барьеры привлекает повышенный интерес исследователей с 1952 года, когда Widdas et al предположил, что для проникновения глюкозы через мембрану эритроцита необходимы особые белки-переносчики для облегчения ее диффузии. В последние десятилетия были открыты два основных семейства транспортеров глюкозы.

Одним из основных являются сочетанные транспортеры глюкозы и ионов Na^+ (SGLT), иначе известные как активные котранспортеры или симпортеры. Выделяют три типа SGLT: SGLT1, SGLT2 и SGLT3. SGLT1 (локус 22q13.1) отвечает за абсорбцию глюкозы из желудочно-кишечного тракта. SGLT2 (локус 16p11.2), также обозначаемый как SLC5A2), вместе с SGLT1, отвечает за абсорбцию глюкозы в почечных канальцах. SGLT3 (локус 22q12.2-q12.3) локализуется в плазматической мембране нейронов кишечника и скелетных мышц.

Другим большим семейством белков-переносчиков глюкозы является группа белков GLUT. Эти белки-транспортеры облегчают пассивную диффузию глюкозы через тканевые барьеры с помощью энергонезависимых механизмов.

Группа включает в себя 12 белков GLUT. GLUT1 экспрессируется в эндотелиальных клетках сосудов, входящих в состав гематоэнцефалического барьера и отвечает за проникновение глюкозы в головной мозг, GLUT2 ассоциирован с синдромом Фанкони – Бикель, GLUT3 отвечает за проникновение глюкозы через мембрану нейрональной плазмы, GLUT4 является инсулин-регулирующим транспортером глюкозы жировой ткани, сердечной мышцы и скелетных мышц, и отвечает за инсулинопосредованный транспорт глюкозы, GLUT5 экспрессируется в кишечнике, тестикулах и почках. Функция GLUT7 на данный момент неизвестна [18-20].

Синдром дефицита транспортера глюкозы тип 1 впервые был описан в 1991 г. С того времени в мире было описано более 100 пациентов во всем мире.

Синдром дефицита транспортера глюкозы тип 1 (GLUT1 deficiency syndrome, болезнь де Виво, OMIM #606777, ORPHA71277) характеризуется развитием ранней детской энцефалопатии, симптоматической эпилепсии с резистентностью к противоэпилептическим препаратам, формированием микроцефалии, психомоторной задержкой со спастичностью, атаксией, дизартрией и альтернирующей гемиплегией.

Синдром дефицита GLUT1 представлен 2 клиническими формами:

1. **Классическая форма** (~ 90% больных). Судороги обычно начинаются в возрасте от 1 до 6 месяцев в ~ 70% случаев, в возрасте до 2-х лет в ~ 90%, а в возрасте старше 2-х лет в ~ 10% случаев. Данная форма синдрома характеризуется задержкой неврологического развития, дизартрией, наличием микроцефалии и двигательных расстройств, включая атаксию, дистонию и хорею;
2. **Неэпилептическая форма** (~ 10% - 15% больных). Пациенты с данной формой синдрома имеют более мягкий фенотип, с отсутствием судорожного синдрома и ярко выраженными пароксизмальными дискинезиями, включая перемежающуюся атаксию, хореоатетоз, дистонию, и альтернирующую гемиплегию.

Клинические симптомы синдрома дефицита GLUT1 усугубляются голодом или увеличением промежутков между приемами пищи с некоторым улучшением состояния после еды. Пациенты с классическим течением синдрома дефицита GLUT1, рожденные после физиологически протекавшей беременности и родов, имеют нормальную массу тела при рождении и оценку по шкале Апгар.