

© Коллектив авторов, 2014

Н.О. Брюханова^{1,2}, С.С. Жилина^{1,2}, М.С. Беленикин^{1,2}, Г.Р. Мутовин^{1,2},
С.О. Айвазян¹, А.Г. Притыко^{1,2}

ВОЗМОЖНОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ ПРИ РЕЗИСТЕНТНЫХ ФОРМАХ ЭПИЛЕПСИИ

¹ГБУЗ НПЦ Медицинской помощи детям с пороками развития челюстно-лицевой области и врожденными заболеваниями нервной системы ДЗМ, ²ГОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, РФ

Bryuhanova N.O.^{1,2}, Zhilina S.S.^{1,2}, Belenikin M.S.^{1,2}, Mutovin G.R.^{1,2},
Ayvazyan S.O.¹, Prityko A.G.^{1,2}

GENETIC TESTING POSSIBILITIES IN THE RESISTANT FORMS OF EPILEPSY

¹Medical care center for children with maxillofacial area malformations and nervous system congenital diseases,
²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Увеличивающееся разнообразие форм идиопатических эпилепсий ведет к тому, что у врача возникают трудности с алгоритмом обследования. Идентификация мутации у пациента может уточнить диагноз, предложить прогноз, оказать помощь в лечении (резистентность к антиэпилептическим препаратам), избавить от диагностических процедур. Для подтверждения *SCN1A*-ассоциированных эпилепсий используют секвенирование экзонов гена *SCN1A*. Причиной заболевания может быть микроделеция или изменение копийности участков гена, что требует использования дополнительных методов исследования. В статье представлены результаты молекулярно-генетического исследования *SCN1A* у 40 пациентов с эпилепсией и этапы обследования при проведении дифференциального диагноза.

Ключевые слова: эпилепсия, нейрональный натриевый канал, секвенирование *SCN1A*, синдром Драве, резистентность к антиэпилептическим препаратам.

An increasing variety of idiopathic epilepsy forms leads to the difficulties in choosing of survey algorithm. Identification of the mutation in the patient may clarify the diagnosis, offer prognosis, assist in the treatment (resistance to antiepileptic medicines), and eliminate the diagnostic procedures. Sequencing of the gene *SCN1A* exons is used to confirm *SCN1A*-associated epilepsies. Disease may be caused by microdeletion or changes in gene copy number, which requires additional research methods. The article presents the results of genetic research *SCN1A* in 40 patients with epilepsy and examination stages in the differential diagnosis.

Keywords: epilepsy, neuronal sodium channel, sequencing *SCN1A*, Dravet syndrome, resistance to anti-epileptic medicines.

Увеличивающееся число клинических форм идиопатических генерализованных эпилепсий и эпилептических энцефалопатий с резистентностью к антиэпилептическим препаратам (АЭП)

ведет к тому, что у врача возникают трудности с дифференциальной диагностикой. Выявление конкретного генетического дефекта у пациента с эпилепсией может уточнить диагноз, определить

Контактная информация:

Брюханова Наталия Олеговна – младший научный сотрудник НПЦ МПД
Адрес: Россия, 119620, г. Москва, ул. Авиаторов, 38
Тел.: (916) 348-60-99,
E-mail: nataliabruhanova@gmail.ru
Статья поступила 10.12.14,
принята к печати 24.06.15.

Contact Information:

Bryukhanova Natalia Olegovna – Junior Researcher, Medical care center
Address: Russia, 119620, Moscow, Aviatorov str., 38
Tel.: (916) 348-60-99,
E-mail: nataliabruhanova@gmail.ru
Received on Dec. 10 2014,
submitted for publication on Jun. 24, 2015.

прогноз течения болезни и возможности лечения, оценить риск заболевания для родственников.

В настоящее время в соответствии с базовым определением идиопатических генерализованных эпилепсий Международная противоэпилептическая лига выделяет 7 синдромов: доброкачественная миоклоническая эпилепсия раннего детского возраста, генерализованная эпилепсия с фебрильными приступами плюс, эпилепсия с миоклоническими абсансами, эпилепсия с миоклонически-астатическими приступами, детская абсанс-эпилепсия, юношеская миоклоническая эпилепсия и эпилепсия с изолированными тонико-клоническими приступами [1].

Наиболее распространенной генетической причиной доброкачественной генерализованной эпилепсии с фебрильными судорогами плюс, тяжелой миоклонической эпилепсии новорожденных (ТМЭН) или синдрома Драве (OMIM: 607208) и редких случаев семейной гемиплегической мигрени являются мутации в гене α 1-субъединицы нейронального натриевого канала (*SCN1A*). Впервые *de novo* мутации в гене *SCN1A*, кодирующем натриевый канал NaV 1.1, у пациентов с синдромом Драве были найдены в 2001 г. [2]. В настоящее время известно около 1000 мутаций в гене *SCN1A*, из которых более 50% являются миссенс-мутациями. Ген *SCN1A*, кодирующий α -субъединицу ионного канала, локализован на длинном плече хромосомы 2 (2q24.3), имеет размер ~85 тыс п.н.о. и включает 26 экзонов. Размер белок-кодирующего участка составляет 6030 п.н.о. α -субъединица потенциал-зависимого натриевого канала NaV 1.1 образована 4 доменами (обозначаются как D1–D4); каждый домен содержит 6 трансмембранных сегментов (обозначаются как S1–S6). Наибольшая плотность значимых мутаций наблюдается в петельных областях между трансмембранными сегментами S5 и S6, формирующих пору канала. Для доменов D1–D3 известно большее число мутаций в этой петельной области по сравнению с D4 [6]. Нонсенс- и миссенс-мутации, приводящие к локальным изменениям структуры рецептора или канал-формирующей поры (между сегментами S5 и S6), приводят к более тяжелому фенотипу [7], тогда как микроделеции могут привести к более легкой форме заболевания [8]. Эти мутации ведут к изменениям структуры натриевого канала, что нарушает ток ионов натрия внутрь клетки и вызывает гипервозбудимость нейронов, усиливая деполяризацию мембраны.

В последние годы значительно расширился спектр детских эпилептических энцефалопатий, ассоциированных с мутациями в гене *SCN1A*. Сюда включены криптогенная фокальная и генерализованная эпилепсия, синдром Дузе (миоклонически-астатическая эпилепсия), синдром Леннокса–Гасто [3] и так называемая вакцин-ассоциированная энцефалопатия [4, 5]. Пограничная ТМЭН (ПТМЭН) и рефрактерная детская эпилепсия с генерализованными тонико-

клоническими приступами (РДЭГТКП) имеют клинические проявления, сходные с ТМЭН, но с отсутствием миоклонических приступов и менее тяжелыми психомоторными нарушениями [5].

Наиболее часто встречающаяся нозологическая форма среди обследованных детей — это генерализованная эпилепсия с фебрильными судорогами плюс (ГЭФС+), эпилепсия с аутосомно-доминантным типом наследования и с неполной пенетрантностью гена (70–80%).

Впервые ГЭФС+ описана в 1997 г. [6]. Наиболее распространенный фенотип характеризуется началом заболевания в детском возрасте с фебрильных судорог. В дальнейшем появляются афебрильные судороги (в т.ч. абсансы), миоклонические, атонические и редкие миоклонико-астатические приступы. При этом на ЭЭГ обычно регистрируются диффузная спайк-волновая активность и фотосенситивность.

Представляем результаты молекулярно-генетического исследования гена *SCN1A* у 40 пациентов с генерализованными и фокальными формами эпилепсии с резистентностью к АЭП и необходимые этапы обследования пациентов с идиопатическими формами эпилепсии при проведении дифференциального диагноза.

Материалы и методы исследования

Отбор пациентов проводили совместно с врачами-эпилептологами среди больных идиопатической эпилепсией, наблюдающихся в НПЦ Медицинской помощи детям с пороками развития челюстно-лицевой области и врожденными заболеваниями нервной системы, в соответствии с критериями резистентности: клиническими симптомами, МРТ головного мозга, данными видео-ЭЭГ-мониторинга и фармако-мониторинга АЭП [9].

Резистентной (некурабельной) называют эпилепсию, при которой тяжесть и частота приступов, неврологические и психологические нарушения или побочные действия АЭП не поддаются удовлетворительной коррекции и (или) неприемлемой 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 [9]. В рамках научной программы были обследованы 40 пациентов с различными клиническими формами идиопатической эпилепсии в связи с резистентностью к АЭП. Наиболее распространенной причиной возникновения резистентности к АЭП считается наличие мутаций в гене *SCN1A*.

Поиск мутаций в гене *SCN1A* проводили на секвенаторе 454 GS Junior с использованием олигонуклеотидных зондов NimbleGen.

Результаты

У 7 пациентов были выявлены мутации в гене *SCN1A* (17%). Клинические и молекулярно-генетические данные приведены в таблице.

Клинические диагнозы, указанные в таблице,

Спектр мутаций, выявленных у обследованных больных эпилепсией

Пациенты	Мутация	Диагноз
Пациент О.	166930011:T>A:Lys>Ter (exon1)	G40.4 ПТМЭН
Пациент Д.	166912936:C>T:Trp>Term (exon 3)	G40.3 ГЭФС+
Пациент С.	166904163:C>A, Asp>Tyr (exon 8)	G40.2 Эпилепсия симптоматическая с фокальными приступами с нарушением сознания, задержка психоречевого развития
Пациентка К.	166872146:G>C, Thr>Ser (exon 17)	G40.3 ГЭФС+, ремиссия с 07.2011 г., задержка психоречевого развития
Пациент Ю.	166872146:G>C: Thr>Ser (exon 17)	G40.3 ГЭФС+
Пациентка Т.	166872146:G>C: Thr>Ser (exon 17)	G40.0 Атипичная доброкачественная фокальная эпилепсия детского возраста (синдром псевдо-Леннокса)
Пациент Р.	166848441:T>G: Ile>Leu (exon26)	G40.3 ГЭФС+

были установлены до генетического тестирования по результатам стандартного обследования больных эпилепсией.

Анализ литературных и данных, полученных нами в ходе обследования группы больных идиопатической эпилепсией, резистентной к АЭП, выявил широкий спектр фенотипических проявлений *SCN1A*-ассоциированных эпилепсий, а именно: фокальная эпилепсия с тонико-клоническими приступами, генерализованная эпилепсия с миоклоническими, миоклонически-астатическими приступами. Нужно отметить, что у 4 пациентов из 7 моторное и психоречевое развитие соответствовало возрасту, а один ребенок в течение 2 лет находится в медикаментозной ремиссии. На сегодняшний день не описано каких-либо корреляций между фенотипом и генотипом при *SCN1A*-ассоциированных эпилепсиях, при этом выявление области генетической поломки в гене сложно связать с тяжестью клинических проявлений [3–6]. При анализе полученных данных мутации в гене *SCN1A* были выявлены только у 7 из 40 обследованных больных (17,5%). В то же время при подозрении на *SCN1A*-ассоциированную эпилепсию следует учитывать, что одним из ограничений методов ДНК-диагностики, обычных ПЦР-амплификации и секвенирования, является невозможность обнаружения вставки или делеции больших участков гена *SCN1A*, а также изменение числа копий отдельных его фрагментов. Поэтому отсутствие мутаций при использовании таких методов ДНК-диагностики мутаций в гене *SCN1A* необходимо интерпретировать с осторожностью. Во избежание получения ложноотрицательных результатов желательно использовать дополнительные методы диагностики, например хромосомный микроматричный анализ (ХМА) и мультиплексную амплификацию лигированных зондов (MLPA). Так, при обследовании пациентки И. мутаций в гене не было обнаружено, поэтому было принято решение использовать другие гене-

тические методы диагностики. При ХМА была выявлена микроделеция размером 2871112 п.н. (164986570-167857682), захватывающая регион 2q24.3, в котором расположен ген *SCN1A*.

Обсуждение

Идиопатическая генерализованная эпилепсия является сложной и генетически неоднородной группой синдромов. В одних случаях постановка клинического диагноза не вызывает трудностей, в других – установить форму эпилепсии может быть достаточно сложно из-за многообразия клинических признаков. Отсюда возникает множество вопросов у врача-клинициста при направлении больных на генетическое тестирование.

Секвенирование *SCN1A* и других генов, ассоциированных с эпилепсией, является одним из методов доказательной медицины. Но нужно помнить, что само по себе выявление мутации в гене *SCN1A* не позволяет провести дифференциальную диагностику между формами *SCN1A*-ассоциированной эпилепсии, следовательно, клиническая картина заболевания остается ведущей для постановки диагноза. Неврологам и генетикам необходимо четко выделять группу пациентов, направляемых на секвенирование гена *SCN1A*. При проведении дифференциального диагноза важно в первую очередь исключить заболевания, при которых разработана патогенетическая терапия [10], такие как: 1) пиридоксинзависимые судороги; 2) врожденные нарушения метаболизма, в т.ч. митохондриальная патология; 3) дефицит биотинидазы; 4) судороги, чувствительные к приему фолиевой кислоты; 5) дефицит транспорта глюкозы тип 1 (болезнь Де Виво), который проявляется низкими концентрациями глюкозы в цереброспинальной жидкости и отвечает на богатый жирами рацион; 6) печеночные порфирии, при которых выявляются порфирины в моче и снижение порфириноген-деаминазы в эритроцитах.

Следующим этапом является исключение наследственных форм эпилепсии, не связанных с мутациями в гене *SCN1A* [10]: 1) доброкачественные семейные неонатальные судороги (ассоциированы с мутациями в генах *KCNQ2*, *KCNQ3*); 2) доброкачественная эпилепсия детства с центротемпоральными спайк-волнами (*KCNQ2*, *KCNQ3*); 3) затылочная эпилепсия детства; 4) абсансы; 5) аутосомно-доминантная ночная лобная эпилепсия; 6) семейная височная эпилепсия.

По мере накопления данных появляется все больше информации о взаимосвязи *SCN1A*-ассоциированных эпилепсий с мутациями в других генах [11, 12]. В частности, были описаны связи фенотипа синдрома Драве и полиморфизмов в генах натриевых и кальциевых каналов *SCN9A* [21], *CACN1A*, *CACNB4* [12]. E. Gaily и соавт. сообщают о наличии гетерозиготных мутаций в гене полимеразы *POLG* и в гене *SCN1A* [13]. Не всегда наличие полиморфизмов может подтверждать клинический диагноз. Так, примерно у 13% пациентов с фенотипом синдрома Драве были выявлены вариации числа копий отдельных участков гена [14]. Клиника может быть обусловлена делецией отдельных экзонов или даже всего гена.

Заключение

Путь молекулярно-генетического тестирования лиц, страдающих идиопатической эпилепсией, резистентной к АЭП, имеет множество этапов: молекулярное кариотипирование при наличии фенотипических особенностей, исследование «горячих точек» гена *SCN1A* и, наконец, секвенирование всего гена *SCN1A*. Клиническая картина при одинаковых мутациях у разных пациентов может варьировать. *SCN1A*-ассоциированная эпилепсия нередко обусловлена не только генными мутациями, определяемыми с помощью прямого секвенирования, но и делециями (до 27%) или изменением копияности отдельных участков гена *SCN1A* [15], что выявляется с помощью ХМА и МЛПА-анализа. При отсутствии мутаций в гене *SCN1A* показано продолжить поиск мутаций в генах *SCN1B*, *GABRG2*, *SCN2A*, *SCN9A*, *CACN1A*, *CACNB4*. Ведущими в постановке клинического диагноза и определении тактики медицинского сопровождения при выявлении мутации в гене *SCN1A* и в других генах, ассоциированных с резистентной к АЭП эпилепсией, все-таки являются характер приступов, ЭЭГ-картина и данные МРТ-исследования.

Литература

1. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia*. 1989; 30: 289–299.
2. Claes L, Del-Favero J, Ceulemans B. De novo mutations in the sodium-channel gene *SCN1A* cause severe myoclonic epilepsy of infancy. *Am. J. Hum. Genet.* 2001; 68: 1327–1332.
3. Harkin LA, McMahon JM, Iona X. The spectrum of *SCN1A*-related infantile epileptic encephalopathies. *Brain*. 2007; 130: 843–852.
4. Berkovic SF, Harkin L, McMahon JM. De-novo mutations of the sodium channel gene *SCN1A* in alleged vaccine encephalopathy: a retrospective study. *Lancet Neurol.* 2006; 5: 488–492.
5. Fujiwara T, Sugawara T, Mazaki-Miyazaki E. Mutations of sodium channel alpha subunit type 1 (*SCN1A*) in intractable childhood epilepsies with frequent generalized tonic-clonic seizures. *Brain*. 2003; 126: 531–546.
6. Scheffer IE, Berkovic SF. Generalized epilepsy with febrile seizures plus. A genetic disorder with heterogeneous clinical phenotypes. *Brain*. 1997; 120: 479–490.
7. Zuberi SM, Brunklaus A, Birch R. Genotype-phenotype associations in *SCN1A*-related epilepsies. *Neurology*. 2011; 76: 594–600.
8. Suls A, Velizarova R, Yordanova I. Four generations of epilepsy caused by an inherited microdeletion of the *SCN1A* gene. *Neurology*. 2010; 75: 72–76.
9. Kwan P, Brodie MJ. Emerging drugs for epilepsy. *Exp. Opin. Emerging. Drugs*. 2007; 12: 407–422.
10. Roger J, Bureau M, Dravet C. *Epileptic Syndromes in Infancy, Childhood and Adolescence*. 3 ed. Eastleigh, UK: John Libbey, 2006.
11. Mulley JC, Hodgson B, McMahon JM. Role of the sodium channel *SCN9A* in genetic epilepsy with febrile seizures plus and Dravet syndrome. *Epilepsia*. 2013; 54: 122–126.
12. Ohmori I, Ouchida M, Kobayashi K. *CACNA1A* variants may modify the epileptic phenotype of Dravet syndrome. *Neurobiol. Dis.* 2013; 50: 209–217.
13. Gaily E, Anttonen AK, Valanne L. Dravet syndrome: new potential genetic modifiers, imaging abnormalities, and ictal findings. *Epilepsia*. 2013; 54: 1577–1585.
14. Suls A, Claeys KG, Goossens D. Microdeletions involving the *SCN1A* gene may be common in *SCN1A*-mutation-negative *SMEI* patients. *Hum. Mutat.* 2006; 27: 914–920.
15. Marini C, Scheffer IE, Nabbout R. *SCN1A* duplications and deletions detected in Dravet syndrome: implications for molecular diagnosis. *Epilepsia*. 2009; 50: 1670–1678.