

## **АНАЛИЗ МУТАЦИЙ ГЕНОВ У БОЛЬНЫХ С НАСЛЕДСТВЕННЫМИ КАВЕРНОЗНЫМИ МАЛЬФОРМАЦИЯМИ ЦНС В РОССИЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ.**

Белоусова О.Б., Булыгина Е.С., Окишев Д.Н., Прохорчук Е.Б., Цыганкова С.В., Пронин И.Н., Шишкина Л.В., Рыжова М.В., Скрыбин К.Г., Коновалов А.Н.

e-mail для связи: [okishev@neurovascular.ru](mailto:okishev@neurovascular.ru)

моб.: +7 905 5439987 (Окишев Дмитрий Николаевич)

1 - Федеральное Государственное Автономное Учреждение «Научно-Исследовательский Институт нейрохирургии имени академика Н. Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва;

2 - Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва;

3 - Национальный Исследовательский Центр "Курчатовский институт", Москва.

### **РЕФЕРАТ (РЕЗЮМЕ)**

Среди кавернозных мальформаций (каверном, КМ) ЦНС около 10 - 30% относятся к наследственной форме патологии с аутосомно-доминантным типом наследования. Генные мутации, обуславливающие развитие заболевания, активно изучаются. Создаются тест-системы для диагностики патологии, в экспериментальных условиях апробируются препараты, блокирующие патологические каскады ангиогенеза.

**Цель работы.** Определение мутаций генов, ассоциированных с формированием церебральных кавернозных мальформаций, у больных с наследственной формой заболевания в российской популяции.

**Материал и методы.** Генетические исследования выполнены у 73 больных: 29 - с наследственной формой заболевания, 6 - с условно доказанными семейными каверномами и 38 - со спорадическими каверномами. Во всех случаях выполнен поиск крупных мутаций методом мультиплексной амплификации лигазно-связанных проб (MLPA). В тех случаях, когда крупные изменения генов у больных с клинически доказанными наследственными формами не были обнаружены, выполнено полноэкзомное секвенирование для выявления и анализа точечных мутаций и полиморфизмов (SNP).

**Результаты.** В 14 образцах выявлены крупные перестройки в трех известных генах КМ (*CCM1*, *CCM2*, *CCM3*), в т.ч. у 5 больных, у которых наследственный характер болезни не был установлен по клинико-нейровизуализационным данным. Общее количество больных с

однонуклеотидными мутациями составило 13 человек, а общее количество больных с мутацией в генах КМ – 27 человек. Мутации в генах выявлены в 91,7% обследованных семей. В двух случаях найдены ранее не описанные делеции в гене *CCM3*. Соотношение генов *CCM1*, *CCM2* и *CCM3* составило 60,7%, 32,2% и 7,1% соответственно. У двух человек из семьи с наследственными каверномами в известных генах КМ мутаций с высоким эффектом не обнаружено. Для больных с мутациями было характерно более тяжелое течение заболевания. Наиболее агрессивное клиническое течение отмечено у больных с мутациями в гене *CCM3*. Случаи роста и новообразования каверном (6) наблюдались только у больных с мутациями в генах КМ.

**Выводы.** Распределение частоты мутаций в трех генах КМ в нашей серии и по данным других крупных исследований совпадают. Наследственные каверномы склонны к более тяжелому клиническому течению. Наследственные формы каверном могут быть обусловлены мутациями вне известных генов КМ.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** кавернома, кавернозная мальформация ЦНС, наследственные каверномы, мутации генов каверном.

## **GENE MUTATIONS IN PATIENTS WITH HEREDITARY CAVERNOUS MALFORMATIONS IN THE RUSSIAN POPULATION.**

Belousova O.B.<sup>1</sup>, Boulygina E.S.<sup>3</sup>, Okishev D.N.<sup>1</sup>, Prohorchuk E.B.<sup>2</sup>, Tsygankova S.V.<sup>3</sup>, Pronin I.N.<sup>1</sup>, Shishkina L.V.<sup>1</sup>, Ryzhova M.V.<sup>1</sup>, Skryabin K.G.<sup>2,3</sup>, Kononov A.N.<sup>1</sup>

1 - Burdenko Scientific Research Neurosurgery Institute, Russia, Moscow

2 - Research Center of Biotechnology, Russia, Moscow

3 – National Research Center "Kurchatov Institute", Russia, Moscow

### **ABSTRACT**

Familial cerebral cavernous malformations (CCMs) account for about 10 - 30% of cases and have autosomal dominant inheritance. The three known genes associated with the development of CCMs (*CCM1*, *CCM2*, *CCM3*) and their signaling pathways are extensively studied in various cohorts of population.

**Objective.** Identification of CCM genes mutations in patients with hereditary and sporadic CCMs in Russian population.

**Methods.** Blood samples from 73 randomly selected patients were examined, among them – 29 MRI-confirmed familial cases, 8 clinically confirmed familial cases and 38 so-called sporadic cases. Presence of large deletions/duplications was detected by multiplex ligation-dependent probe amplification (MPLA). For MPLA-negative samples, the whole genome sequencing was performed to search single nucleotide mutations (SNP).

**Results.** Deletions in the CCM genes were identified in 14 samples, including 5 patients without definitely established familial type and sporadic cases. SNP mutations were found in 13 samples. Genes distribution was as follows: 60.7% for *CCM1*, 32.2% for *CCM2*, and 7.1% for *CCM3*. Mutations were detected in 91.7% of familial cases. In two patients new *CCM3* deletions were found. De novo formation and growth of the CCMs were observed only in patients with mutations. Two patients with *CCM3* mutations (one familial, one probably familial) demonstrated the most aggressive clinical course.

**Conclusion.** Distribution of pathogenic mutations in known CCM genes in this first Russian study of CCM genes was similar to published series. Familial CCMs in general and those with mutations in gene *CCM3* seems to have more prominent symptoms.

**Keywords:** familial cerebral cavernous malformation, genes *CCM1*, *CCM2*, *CCM3*, detection of gene mutations.

## ВВЕДЕНИЕ

Наследственные (семейные) кавернозные мальформации (КМ, каверномы) ЦНС составляют, по различным данным, 10 – 30% всех каверном. Они наследуются аутосомно-доминантно с различной пенетрантностью и экспрессивностью признака [1, 2]. В ходе многочисленных генетических исследований, выполненных за последние 30 лет, выявлено три гена, гетерозиготные мутации которых ассоциированы с формированием наследственных каверном - так называемые гены *CCM* (cerebral cavernous malformations): *CCM1* (7q21-22, OMIM 604214) [3, 4], *CCM2* (7p13-15, OMIM 607929) [5, 6], и *CCM3* (3q25.2-27 OMIM 609118) [7, 8]. Эти гены отвечают за синтез трех белков: Krit1 (krev interaction trapped 1), OSM (osmosensing scaffold for MEKK3) и malcaverin (PDCD10 - programmed cell death 10) соответственно [9]. Данные белки работают в комплексе, обеспечивая сложные взаимодействия эндотелиальных клеток с другими элементами клеточной стенки и формирование микроваскулярного русла в мозговой ткани. В настоящее время ведутся исследования по расшифровке молекулярных механизмов этого взаимодействия [10, 11, 12].

Существование наследственных форм каверном, связанных с установленными мутациями, позволило включить данную патологию в реестр моногенных заболеваний (MIM/OMIM 116860).

**ЦЕЛЬ РАБОТЫ:** выявление мутаций генов кавернозных мальформаций ЦНС у больных с наследственной формой патологии в российской популяции.

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ**

За период с 1993 по 2015 годы в НИИ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко обследовано более 1500 больных с кавернозными мальформациями ЦНС. Среди них выявлено 36 семей (79 человек) с наследственными каверномами, подтвержденными методами нейровизуализации (доказанные случаи), и 26 человек, у которых семейный характер патологии доказан только по клиническим данным, без нейровизуализационного подтверждения (далее – условно доказанные случаи). Образцы крови для генетических исследований взяты у 29 человек из 16-ти семей с доказанной формой патологии, выбранных случайным образом (больные с клинически проявившимися каверномами, бессимптомные носители каверном), у 6 человек с условно доказанными семейными каверномами, а также у 38 больных со спорадическими одиночными и множественными каверномами. При доказанной наследственной форме в одной семье образцы крови были взяты у 4х человек, в 10 семьях – у 2х человек, в 5 семьях обследовано по одному человеку. Таким образом, собрана коллекция ДНК, насчитывающая 73 образца крови больных. Средний возраст больных составил  $30,1 \pm 14,3$  года, соотношение мужчин и женщин - 27 : 46. Операция удаления каверномы выполнена в 54 случаях, 19 больных получают консервативную терапию или находятся под наблюдением.

*Генетический анализ.* Для анализа крупных структурных перестроек (делеций/вставок) в генах КМ использовали метод мультиплексной амплификации лигазно-связанных проб (MLPA, Multiplex ligation-dependent probe amplification). В анализ были включены все 73 образца. В тех случаях, когда крупные изменения генов у больных с наследственными формами не были обнаружены, выполнено полноэкзомное секвенирование и последующее выявление однонуклеотидных мутаций (SNP, Single nucleotide polymorphism). Эти исследования были выполнены только у одного члена каждой семьи, так как при наследственной форме этого достаточно. Всего было проанализировано 8 образцов крови (7 – доказанные семьи, 1 – условно доказанная семья). Анализ полиморфизмов проводился с помощью программы StationX. Оценка значимости мутаций проводилась с использованием программы Polyphen.

*Клинико-нейрорадиологический анализ.* У каждого больного оценены следующие параметры течения заболевания и данных МРТ: возраст манифестации, кровоизлияние в анамнезе, количество и размер каверном, новообразование и рост каверном. Каверномы оценивались как «активные» при манифестации заболевания до 18 лет, кровоизлияний в

анамнезе, размере каверномы более 2 см, новообразовании и/или росте каверном, зафиксированных нейровизуализационными методами [13].

## **РЕЗУЛЬТАТЫ**

Методом MLPA в 14 образцах выявлены крупные перестройки: делеции двух и более экзонов. Из этих образцов 9 относились к доказанным наследственным случаям (5 семей), 2 - к условно доказанным случаям (2 семьи), 3 - к так называемым спорадическим случаям. Выявление мутаций в 5-ти последних случаях свидетельствует о наследственном характере патологии, поэтому при дальнейшем анализе эти наблюдения были включены в группу наследственных. В 12 случаях выявлены делеции, описанные ранее. В двух случаях обнаружены ранее не описанные делеции в гене *CCM3*. SNP анализ 8 образцов выявил мутации с высоким эффектом на структуру и функции кодируемого белка в гене *CCM1* в 4-х образцах, в гене *CCM2* – в 2х образцах (изменение последовательности в местах сплайсинга, свиг рамки, приобретенный «стоп») (табл.1). В 2 образцах ни в одном из генов КМ мутаций, имеющих высокий эффект, не обнаружено. Можно предположить, что у этих больных патология обусловлена мутациями в других генах. Подтверждение этого предположения требует дальнейших исследований.

Таким образом, у подавляющего большинства обследованных пациентов с установленной наследственной формой заболевания выявлены существенные изменения в генах КМ – в 11 из 12 семей, обследованных с помощью обоих методов. Кроме того, выявлены крупные перестройки этих генов в случаях, которые по клиническим данным были отнесены к условно доказанным или спорадическим.

Табл. 1

Соотношение формы патологии, клинических данных и выявленных генетических изменений у больных с кавернозными мальформациями ЦНС.

Номер образца	Возраст манифестации, лет	Форма заболевания	Метод выявления мутации	В каком гене выявлена мутация	Описание выявленной мутации	«Клиническая Активность»
9	38	Семейная	MLPA	CCM1	Exon 10 del	нет
10	66	Семейная	MLPA	CCM1	Exon 10 del	есть
17	2,5	Семейная	Полноэкзомное секвенирование	CCM1	Splice site acceptor [chr7.hg19:91842716C>A]	есть
21	14	Семейная	Полноэкзомное секвенирование	CCM1	Frameshift: [p.X216X/c.646*->-AA]	есть
27	бессимптомная	Семейная	Полноэкзомное секвенирование	CCM1	Stop gained: [p.Tyr460*/c.1380T>G]	нет
29	30	Семейная	MLPA	CCM1	Exon 10 del	нет
30	4	Семейная	MLPA	CCM1	Exon 10 del	есть
39	49	Условно семейная	MLPA	CCM1	Exon 4 del	есть
40	1	Семейная	Полноэкзомное секвенирование	CCM2	Frameshift : [chr7. hg19:45104125 -/ACAAA]	есть
44	32	Семейная	MLPA	CCM2	del CCM2	есть
48	34	Спорадическая	MLPA	CCM2	Exon del 7	есть
50	31	Семейная	Полноэкзомное секвенирование	CCM2	splice site donor: [chr7. hg19:g.45078027T>C]	есть
55	20	спорадическая	MLPA	CCM1	Exon 12 del	нет
56	40	Спорадическая	MLPA	CCM1	del CCM1	есть
61	32	У/семейная	MLPA	CCM3	Exons 1-4 del	есть
62	1	Семейная	MLPA	CCM3	Exons 3-4 del	есть
69	49	Семейная	MLPA	CCM1	Exons 8-10 del	есть

70	17	Семейная	MLPA	<i>CCM1</i>	Exons 8-10 del	есть
75	0,1	Семейная	MLPA	<i>CCM2</i>	del CCM2	есть
76	28	Семейная	Полноэкзомное секвенирование	<i>CCM1</i>	splice site donor [chr7.hg19:g.91864120A>C ]	нет
78	19	Спорадическая	MLPA	<i>CCM1</i>	Exon 11 del	есть

Данные по найденной значимой однонуклеотидной мутации у пациентов с наследственной формой были экстраполированы на родственников с верифицированными каверномами. Таким образом, общее количество больных с однонуклеотидными мутациями составило 13 человек, а общее количество больных с мутацией в генах КМ – 27 человек. Количественное соотношение по генам *CCM1*, *CCM2* и *CCM3* составило 60,7%, 32,2% и 7,1% соответственно.

Проведены сопоставления клинического течения заболевания в группе наследственных каверном (I группа), подтвержденных при генетическом анализе, и группе одиночных «спорадических» каверном (II группа). Спорадическими случаи названы условно, так как у этих больных не было выполнено исследование по поиску SNP. Случаи множественных спорадических каверном исключены из анализа, так как множественность каверном ассоциирована с высокой вероятностью наследственной патологии [14]. Так, в нашей серии частота множественных каверном при наследственной форме патологии составила 76%, а в группе всех «спорадических» каверном – 14,7%.

Из 73 больных так называемые «активные» каверномы обнаружены у 44. Не было выявлено отличия в количестве «активных» каверном в I и II группах. Кровоизлияния в анамнезе зафиксированы у 69,6% больных из I группы (16 человек из 23) и у 43,3% больных из II группы (13 человек из 30). Различие имело достоверность на уровне тенденции ( $p=0,06$ ). В группе больных со спорадическими одиночными каверномами не было больных с началом заболевания до 12 лет. В группе пациентов с мутациями заболевание манифестировало в возрасте до 12 лет у 6 человек. Среди этих больных - 3 человека с крупными делециями в генах КМ, 2 – с однонуклеотидными значимыми мутациями, и 1 – с предположительной мутацией вне известных генов КМ. Среди пациентов со спорадическими каверномами не зафиксировано случаев роста и новообразования каверном. В I группе рост и/или новообразование каверном выявлены у шести больных. У 4-х из этих пациентов обнаружены крупные делеции, у 2 - однонуклеотидная значимая мутация.

У двух больных с крупными делециями в гене *CCM3* наблюдалось тяжелое клиническое течение заболевания, характеризующееся повторными кровоизлияниями, ростом и новообразованием каверном.

Приводим наблюдение.

Больная Б-ва, 1977 г.р., впервые обратилась в Институт в январе 2011г.

*Течение болезни:* в сентябре 2010г появилось двоение. При МРТ головы выявлены множественные каверномы головного мозга: правая лобная доля (6мм), четверохолмие (2см) и варолиев мост (1см) (рис.1, А, Б, В, М). Лечилась консервативно. 7.01.2011 развилась



сильная головная боль, усилилось двоение, появилось онемение правой половины тела. При МРТ - признаки кровоизлияния из каверномы среднего мозга. Консультирована в институте, рекомендовано консервативное лечение, однако состояние продолжало ухудшаться – появились эпизоды тошноты, рвоты. При МРТ выявлена окклюзионная гидроцефалия. Госпитализирована в институт, 17.02.2011 выполнена операция «Опорожнение гематомы покрывки среднего мозга, больше справа». *Гистологический диагноз* – капсула гематомы. В послеоперационном периоде состояние улучшилось. В августе 2011г – клиническая картина повторного кровоизлияния из каверномы среднего мозга, с развитием глазодвигательных и мозжечковых симптомов. При МРТ – признаки повторного кровоизлияния из каверномы среднего мозга. 8.11.2011 выполнена операция «Удаление хронической гематомы и каверномы среднего мозга, больше слева». *Гистологический диагноз* – капсула гематомы, кавернозная мальформация. Выписана в удовлетворительном состоянии. Сохранялась очаговая стволовая симптоматика, на дооперационном уровне. Спустя месяц отметила нарастание головной боли, появились приступы по типу окклюзионных. При КТ выявлена окклюзионная гидроцефалия, а на глазном дне – признаки внутричерепной гипертензии. 14.12.2011 выполнена вентрикулостомия 3-го желудочка, 27.12.2011 в связи с ее неэффективностью произведена установка ВПШ справа. Спустя 6 месяцев появилась периодическая рвота, нарушения статики и походки. В сентябре 2012г состояние существенно ухудшилось – участилась рвота, снизилась общая активность, перестала ходить самостоятельно. При МРТ выявлены признаки кровоизлияния в черве и обеих гемисферах мозжечка (рис. 1. Г, Д, Е). Госпитализирована, 15.10.2012 выполнена операция «Удаление гематомы и каверномы мозжечка». *Гистологический диагноз* – капсула хронической гематомы, единичные полости с недифференцированными стенками. Также выявлено новообразование каверномы в правой теменной доле (рис.1, К, Л). В послеоперационном периоде симптоматика частично регрессировала. В последующие 2г 9 мес состояние было стабильным. Была полностью независима в быту. С июля 2015 стала отмечать нарастание двоения, головокружение, шаткость, онемение правой половины тела. При МРТ – признаки повторного кровоизлияния на уровне среднего мозга, больше слева (рис.1, Ж, З, И). Госпитализирована. 11.08.2015 выполнена операция «Удаление кавернозной ангиомы покрывки среднего мозга и верхних ножек мозжечка». *Гистологический диагноз* – кавернозная мальформация со следами кровоизлияний разной давности. В послеоперационном периоде отмечено нарастание глазодвигательных нарушений, которое в последующем существенно уменьшилось.

*Генетический анализ:* образец 61, табл.1.

Спустя 6 месяцев п/о сохраняются легкие глазодвигательные нарушения, мягкая псевдобульбарная симптоматика, легкий левосторонний гемипарез, выраженные нарушения статики, походки, координации. Психопатологическая симптоматика в виде плаксивости, депрессивного настроения, снижения критики. Нуждается в постоянной помощи.

*Семейный анамнез:* отец с молодого возраста страдал паркинсонизмом. Более детальной информации нет. Дочь больной, 2007г.р, здорова, от предложенного МРТ-обследования и взятия крови для генетического исследования родители отказались.

Таким образом, за 5 лет с момента начала заболевания больная с первично множественными каверномами головного мозга перенесла не менее 4 кровоизлияний из каверномы среднего мозга. За период наблюдения сформировались две новые каверномы, одна из которых проявилась тяжелым кровоизлиянием с формированием большой гематомы. Все кровоизлияния приводили к появлению и нарастанию как очаговой, так и общемозговой симптоматики. До последнего ухудшения состояние больной оставалось достаточно компенсированным, и лишь последнее кровоизлияние привело к инвалидности.

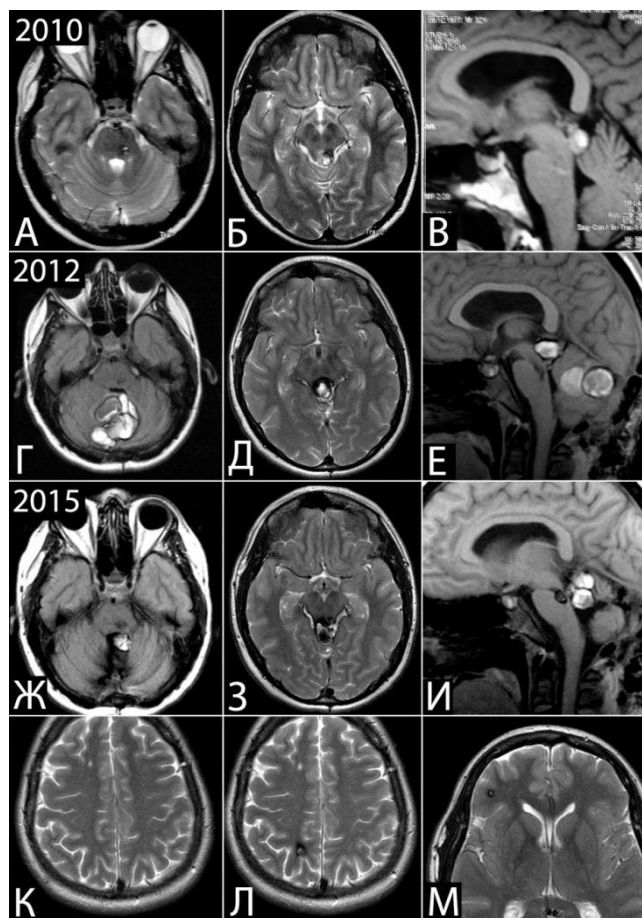


Рис.1 Больная Б. Множественные каверномы головного мозга с повторными кровоизлияниями. Описание в тексте.

А, Б, В – первое МРТ при появлении симптомов, 2010 г.

Г, Д, Е – МРТ перед удалением каверном и гематом ствола и мозжечка, 2012 г.

Ж, З, И - МРТ перед последней операцией по удалению каверномы ствола и верхних ножек мозжечка, 2015г.

К, Л – новообразование каверномы правой теменной доли, 2012 г.

М – кавернома лобной доли.

## **ОБСУЖДЕНИЕ**

Клинические данные о возможном наследовании каверном ЦНС появились около ста лет назад. Долгое время предположение о семейном характере заболевания основывалось на сведениях о клинических проявлениях церебральной патологии у кровных родственников больного, а достоверный диагноз можно было поставить только в случаях хирургических вмешательств у 2-х и более членов одной семьи. С появлением и повсеместным распространением МРТ, а также совершенствованием точности этого метода, возможности по выявлению наследственных каверном существенно возросли. К настоящему времени описано множество наблюдений, когда МРТ обследование клинически здоровых родственников больных со спорадическими каверномами позволяло установить семейный характер патологии [15, 16]. Специфичность клинико-инструментального подхода высока, что подтверждается и данными нашей серии - у подавляющего большинства обследованных пациентов с установленной таким образом наследственной формой заболевания выявлены значимые мутации в известных генах КМ. В то же время, чувствительность инструментального метода требует уточнения. Самым точным методом определения наследственной формы каверном на настоящий момент следует признать генетическое исследование.

Существование наследственных и спорадических форм каверном многие авторы объясняют с помощью гипотезы «двойного удара» Кнудсена, выдвинутой для объяснения аналогичных форм ретинобластом (Knudsen) [17]. Согласно этой гипотезе, в случае наследственной формы заболевания мутация в первом аллеле происходит в клетках зародышевой линии (наследственная мутация), а вторая мутация («второй удар») — в соматических. В соответствии с этими представлениями, спорадическая форма заболевания может быть результатом двух мутаций в соматической клетке. В нашей серии у 3 из обследованных больных (7,9%) с предположительно спорадической формой заболевания выявлены крупные мутации в генах КМ, что позволяет говорить о наследственном характере болезни. Поскольку не все образцы крови были исследованы с помощью крайне дорогого метода анализа (SNP), данная цифра, скорее всего, занижена.

В различных работах приводятся разные данные по распространенности мутаций в трех генах КМ. Согласно данным двух больших серий, соотношение генов *CCM1/CCM2/CCM3* составляет 71,5% : 20,1% : 8,4% (333 пациента) [14] и 63% : 19% : 18% (300 пациентов) [18] соответственно. Во всех сериях преобладают мутации гена *CCM1* с последующим изменением белка K<sub>rit1</sub>. Проведенный нами анализ также показал, что основное число наследственных случаев обусловлено мутациями в гене *CCM1*. Соотношение генов *CCM1/CCM2/CCM3* в нашей серии составило 60,7% : 32,2% : 7,1%, что соответствует данным других исследований.

В определении «активности» каверном мы руководствовались ранее предложенными критериями [13]. Следует признать, что эти критерии достаточно условны, однако более точная оценка биологического поведения каверном до настоящего времени не разработана. Отсутствие значимых различий «активности» каверном в наследственной и спорадической группах нашей серии, возможно, объясняется тем, что в исследование попали в основном оперированные и, следовательно, клинически значимые спорадические каверномы. Тем не менее, наши предыдущие исследования и настоящая серия демонстрируют тенденцию к большей частоте кровоизлияний и более раннюю манифестацию заболевания при наследственных каверномах (16). К аналогичным выводам приходят и другие авторы [8]. В этой связи требует изучения тот факт, что в одной семье могут быть пациенты с «активными» и «неактивными» каверномами, и факт различной «активности» каверном у одного больного при множественных формах патологии. Одним из выводов работы также является то, что к серьезным изменениям в фенотипе могут приводить как большие делеции, так и значимые однонуклеотидные полиморфизмы, приводящие к нарушению структуры и функции белка.

Существуют данные о неравноценном клиническом значении мутаций в различных генах КМ. Мутации в *CCM1* связывают с более тяжелым течением заболевания, по сравнению с *CCM2* [14]. Наиболее тяжелые формы заболевания описаны при мутации гена *CCM3 - PDCD10*. Молекулярно-генетические механизмы, лежащие в основе тех или иных клинических проявлений, интенсивно изучаются, но уже сейчас известно, что данный ген связан с регуляцией процессов апоптоза и деления клеток [19]. У больных с мутациями гена *CCM3* описано более раннее начало болезни, большая вероятность геморрагических событий, большее количество каверном в аналогичном возрасте [14, 20, 19]. В ряде работ описано сочетание множественных каверном и множественных менигиом головного мозга у больных с мутацией в *CCM3* [18, 8]. В нашей серии выявлено два больных с делециями в гене *CCM3*. В обоих случаях подтверждается более тяжелое клиническое течение заболевания в виде повторных кровоизлияний, потребовавших оперативного лечения, а

также новообразования и роста каверном. В отношении возраста манифестации в этих случаях делать какие-либо выводы сложно, тем не менее, необходимо отметить, что в одной из семей заболевание у двух братьев проявилось до 5-летнего возраста.

Роль отдельных мутаций каждого из генов КМ требует дальнейшего изучения. По-видимому, она зависит от степени влияния на структуру и функцию белка.

В одной из больших серий по молекулярно-генетическому анализу ДНК у больных с наследственными формами каверном (96 случаев) мутации в генах КМ выявлены в 94% случаев [14]. В нашей серии мутации выявлены у 91,7% семей. Таким образом, в ряде случаев при подтвержденных семейных каверномах ни у пробанда, ни у родственников не удается выявить мутации в генах КМ. Такие наблюдения позволяют предположить существование других генов, мутация в которых приводит к возможности образования каверном [21]. В нашей серии выявлены две семьи, в которых не обнаружено мутаций в генах КМ. В одном случае имеет место верифицированная семейная форма, в другом - условно семейная. В настоящее время продолжается работа по анализу этих семей.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Настоящее исследование – первая в России работа по изучению генетических изменений у больных с различными формами каверном ЦНС.

Полученные данные показали, что при клинически доказанных наследственных каверномах различные мутации генов КМ выявляются в 91,7% случаев. Распределение частоты мутаций в трех генах КМ в российской популяции соответствует распределению в популяциях стран Европы и Америки.

К серьезным изменениям в фенотипе могут приводить как большие делеции, так и значимые однонуклеотидные мутации, приводящие к нарушению структуры и функции белка.

Полученные данные позволяют проводить медико-генетическое консультирование семей с наследственными каверномами ЦНС.

Дальнейшее изучение типов мутаций, а также мутаций вне известных генов КМ, и проведение клинико-генетических сопоставлений позволит создавать диагностические тест-системы, прогнозировать течение заболевания у конкретного индивида и в последующих поколениях, и, возможно, будет способствовать разработке менее дорогих методов генетического анализа при данной патологии.

Работа частично выполнена в рамках тематического плана НИЦ «Курчатовский институт» и при поддержке гранта Президиума РАН по Программе фундаментальных исследований «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий» «Создание тест-системы для идентификации молекулярно-генетических маркеров кавернозных мальформаций центральной нервной системы у больных с наследственной формой патологии», 2014 г.

## ЛИТЕРАТУРА

- 1 Hayman LA, Evans RA, Ferrell RE, Fahr LM, Ostrow P, Riccardi VM. Familial cavernous angiomas: natural history and genetic study over a 5-year period. *Am J Med Genet.* 1982 Feb;11(2):147-60. DOI: 10.1002/ajmg.1320110205
- 2 Bicknell JM, Carlow TJ, Kornfeld M, Stovring J, Turner P. Familial cavernous angiomas. *Arch Neurol.* 1978 Nov;35(11):746-9. doi:10.1001/archneur.1978.00500350050010.
- 3 Laberge-le Couteulx S, Jung HH, Labauge P, Houtteville JP, Lescoat C, Cecillon M, Marechal E, Joutel A, Bach JF, Tournier-Lasserre E. Truncating mutations in CCM1, encoding KRIT1, cause hereditary cavernous angiomas. *Nat Genet.* 1999 Oct;23(2):189-93. doi:10.1038/13815
- 4 Sahoo T, Johnson EW, Thomas JW, Kuehl PM, Jones TL, Dokken CG, Touchman JW, Gallione CJ, Lee-Lin SQ, Kosofsky B, Kurth JH, Louis DN, Mettler G, Morrison L, Gil-Nagel A, Rich SS, Zabramski JM, Boguski MS, Green ED, Marchuk DA. Mutations in the gene encoding KRIT1, a Krev-1/rap1a binding protein, cause cerebral cavernous malformations (CCM1). *Hum Mol Genet.* 1999 Nov;8(12):2325-33. doi: 10.1093/hmg/8.12.2325
- 5 Liquori CL, Berg MJ, Siegel AM, Huang E, Zawistowski JS, Stoffer T, Verlaan D, Balogun F, Hughes L, Leedom TP, Plummer NW, Cannella M, Maglione V, Squitieri F, Johnson EW, Rouleau GA, Ptacek L, Marchuk DA. Mutations in a gene encoding a novel protein containing a phosphotyrosine-binding domain cause type 2 cerebral cavernous malformations. *Am J Hum Genet.* 2003 Dec;73(6):1459-64. Epub 2003 Nov 17 DOI: <http://dx.doi.org/10.1086/380314>
- 6 Denier C, Goutagny S, Labauge P, Krivosic V, Arnoult M, Cousin A, Benabid AL, Comoy J, Frerebeau P, Gilbert B, Houtteville JP, Jan M, Lapierre F, Loiseau H, Menei P, Mercier P, Moreau JJ, Nivelon-Chevallier A, Parker F, Redondo AM, Scarabin JM, Tremoulet M, Zerah M, Maciazek J, Tournier-Lasserre E; Société Française de Neurochirurgie. Mutations within the MGC4607 gene cause cerebral cavernous malformations. *Am J Hum Genet.* 2004 Feb;74(2):326-37. Epub 2004 Jan 22. DOI: <http://dx.doi.org/10.1086/381718>

- 7 Bergametti F, Denier C, Labauge P, Arnoult M, Boetto S, Clanet M, Coubes P, Echenne B, Ibrahim R, Irthum B, Jacquet G, Lonjon M, Moreau JJ, Neau JP, Parker F, Tremoulet M, Tournier-Lasserre E; Société Française de Neurochirurgie. Mutations within the programmed cell death 10 gene cause cerebral cavernous malformations. *Am J Hum Genet.* 2005 Jan;76(1):42-51. Epub 2004 Nov 12. DOI: <http://dx.doi.org/10.1086/426952>
- 8 Spiegler S, Najm J, Liu J, Gkalympoudis S, Schröder W, Borck G, Brockmann K, Elbracht M, Fauth C, Ferbert A, Freudenberg L, Grasshoff U, Hellenbroich Y, Henn W, Hoffjan S, Hüning I, Korenke GC, Kroisel PM, Kunstmann E, Mair M, Munk-Schulenburg S, Nikoubashman O, Pauli S, Rudnik-Schöneborn S, Sudholt I, Sure U, Tinschert S, Wiednig M, Zoll B, Ginsberg MH, Felbor U. High mutation detection rates in cerebral cavernous malformation upon stringent inclusion criteria: one-third of probands are minors. *Mol Genet Genomic Med.* 2014 Mar;2(2):176-85. doi: 10.1002/mgg3.60. Epub 2014 Jan 14.
- 9 Baxter SS, Dibble CF, Byrd WC, Carlson J, Mack CR, Saldarriaga I, Bencharit S. Role of cytoskeletal proteins in cerebral cavernous malformation signaling pathways: a proteomic analysis. *Mol Biosyst.* 2014 Jul;10(7):1881-9. doi: 10.1039/c3mb70199a.
- 10 Edelmann AR, Schwartz-Baxter S, Dibble CF, Byrd WC, Carlson J, Saldarriaga I, Bencharit S. Systems biology and proteomic analysis of cerebral cavernous malformation. *Expert Rev Proteomics.* 2014 Jun;11(3):395-404. doi: 10.1586/14789450.2014.896742. Epub 2014 Mar 31.
- 11 Kar S, Samii A, Bertalanffy H. PTEN/PI3K/Akt/VEGF signaling and the cross talk to KRIT1, CCM2, and PDCD10 proteins in cerebral cavernous malformations. *Neurosurg Rev.* 2015 Apr;38(2):229-36; discussion 236-7. doi: 10.1007/s10143-014-0597-8. Epub 2014 Nov 19.
- 12 Voss K, Stahl S, Schleider E, Ullrich S, Nickel J, Mueller TD, Felbor U. CCM3 interacts with CCM2 indicating common pathogenesis for cerebral cavernous malformations. *Neurogenetics.* 2007 Nov;8(4):249-56. Epub 2007 Jul 27. doi:10.1007/s10048-007-0098-9.
- 13 Maiuri F, Cappabianca P, Gangemi M, De Caro Mdel B, Esposito F, Pettinato G, de Divitiis O, Mignogna C, Strazzullo V, de Divitiis E. Clinical progression and familial occurrence of cerebral cavernous angiomas: the role of angiogenic and growth factors. *Neurosurg Focus.* 2006 Jul 15;21(1):e3. doi:10.3171/foc.2006.21.1.4.
- 14 Denier C, Labauge P, Bergametti F, Marchelli F, Riant F, Arnoult M, Maciazek J, Vicaut E, Brunereau L, Tournier-Lasserre E; Société Française de Neurochirurgie. Genotype-phenotype correlations in cerebral cavernous malformations patients. *Ann Neurol.* 2006 Nov;60(5):550-6. doi:10.1002/ana.20947.
- 15 Labauge P, Laberge S, Brunereau L, Levy C, Tournier-Lasserre E. Hereditary cerebral cavernous angiomas: clinical and genetic features in 57 French families. *Société Française de Neurochirurgie. Lancet.* 1998 Dec 12;352(9144):1892-7. doi:10.1016/s0140-6736(98)03011-6.

- 16 Белоусова О.Б., Коновалов А.Н. Кавернозные мальформации центральной нервной системы. М.: ООО «Киновек»; 2014, 256 с.
- 17 Akers AL, Johnson E, Steinberg GK, Zabramski JM, Marchuk DA. Biallelic somatic and germline mutations in cerebral cavernous malformations (CCMs): evidence for a two-hit mechanism of CCM pathogenesis. *Hum Mol Genet.* 2009 Mar 1;18(5):919-30. doi: 10.1093/hmg/ddn430. Epub 2008 Dec 16.
- 18 Riant F, Bergametti F, Fournier HD, Chapon F, Michalak-Provost S, Cecillon M, Lejeune P, Hosseini H, Choe C, Orth M, Bernreuther C, Boulday G, Denier C, Labauge P, Tournier-Lasserre E. CCM3 Mutations Are Associated with Early-Onset Cerebral Hemorrhage and Multiple Meningiomas. *Mol Syndromol.* 2013 Apr;4(4):165-72. doi: 10.1159/000350042. Epub 2013 Apr 3.
- 19 Cigoli MS, Avemaria F, De Benedetti S, Gesu GP, Accorsi LG, Parmigiani S, Corona MF, Capra V, Mosca A, Giovannini S, Notturmo F, Ciccocioppo F, Volpi L, Estienne M, De Michele G, Antenora A, Bilo L, Tavoni A, Zamponi N, Alfei E, Baranello G, Riva D, Penco S. PDCD10 gene mutations in multiple cerebral cavernous malformations. *PLoS One.* 2014 Oct 29;9(10):e110438. doi: 10.1371/journal.pone.0110438. eCollection 2014.
- 20 Nikoubashman O, Wiesmann M, Tournier-Lasserre E, Mankad K, Bourgeois M, Brunelle F, Sainte-Rose C, Wiesmann M, Zerah M, Di Rocco F. Natural history of cerebral dot-like cavernomas. *Clin Radiol.* 2013 Aug;68(8):e453-9. doi: 10.1016/j.crad.2013.02.010. Epub 2013 May 8.
- 21 Tsutsumi S, Ogino I, Miyajima M, Ikeda T, Shindo N, Yasumoto Y, Ito M, Arai H. Genomic causes of multiple cerebral cavernous malformations in a Japanese population. *J Clin Neurosci.* 2013 May;20(5):667-9. doi: 10.1016/j.jocn.2012.05.041. Epub 2013 Feb 26.