

## Редкая форма неонатального сахарного диабета (НСД), обусловленного дефектом гена *EIF2AK3* (синдром Уолкотта—Раллисона)

К.м.н. Ю.В. ТИХОНОВИЧ<sup>1</sup>, О.В. СТОТИКОВА<sup>2</sup>, д.б.н. П.М. РУБЦОВ<sup>3</sup>, д.м.н. А.Н. ТЮЛЬПАКОВ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России, Москва; <sup>2</sup>ФГБУ «Российская детская клиническая больница» Минздрава России, Москва; <sup>3</sup>ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН, Москва, Россия

Синдром Уолкотта—Раллисона относится к редким формам перманентного неонатального сахарного диабета (ПНСД), связанного с гомозиготными или компаунд-гетерозиготными мутациями в гене *EIF2AK3*. Мутации в гене *EIF2AK3* приводят к функциональным дефектам системы клеточной защиты, генерализации клеточного стресса и индукции апоптоза. Заболевание преимущественно распространено в странах с высоким процентом близкородственных браков и характеризуется сочетанием НСД, задержки роста, скелетной дисплазии и тяжелой патологией печени. Течение СД лабильное со склонностью к тяжелым гипогликемическим состояниям в результате сопутствующего поражения печени и дефектов глюконеогенеза. Дополнительные клинические проявления синдрома включают нарушение экзокринной функции поджелудочной железы, задержку психоречевого развития, поражение почек, нейтропению, гипотиреоз, врожденные пороки сердца и т.д. Прогноз заболевания неблагоприятный. Большинство пациентов погибают в возрасте от 3 до 10 лет от нарушения функции печени или от почечной недостаточности. Применение высокопроизводительного параллельного секвенирования для ранней диагностики заболевания позволяет выбрать оптимальную тактику ведения таких пациентов и рекомендовать родителям проведение пренатальной диагностики при последующих беременностях. Представлено первое описание генетически подтвержденного клинического случая синдрома Уолкотта—Раллисона в отечественной литературе.

*Ключевые слова:* неонатальный сахарный диабет, ген *EIF2AK3*, синдром Уолкотта—Раллисона, спондилоэпифизарная дисплазия.

### Rare form of Permanent Neonatal Diabetes Mellitus (PNDM) due to novel mutation in *EIF2AK3* gene (Wolcott—Rallison syndrome).

Yu.V. TIKHONOVICH<sup>1</sup>, O.V. STOTIKOVA<sup>2</sup>, P.M. RUBTSOV<sup>3</sup>, A.N. TYUL'PAKOV<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Endocrinology Research Centre, Moscow, Russia; <sup>2</sup>Russian Children Clinical Hospital, Moscow, Russia; <sup>3</sup>Engelhardt Institute of Molecular Biology, Moscow, Russia

Wolcott—Rallison syndrome (WRS) is a rare genetic disease inherited in autosomal recessive way. Clinical manifestations develop in early infancy with symptoms of permanent neonatal diabetes mellitus (PNDM), skeletal dysplasia, short stature and hepatic dysfunction. The condition has poor prognosis and most patients die at a young age due to episodes of acute liver or renal failure. To date about 60 genetically proved cases of WRS have been reported worldwide. The disease is most common in countries where consanguineous marriages are frequent, such as the Saudi Arabia (60% cases of PNDM patients), India, Turkey, Pakistan and North Africa. In Russian Federation WRS patients have not been described earlier.

*Keywords:* permanent neonatal diabetes mellitus, *EIF2AK3* gene, Wolcott—Rallison syndrome, *spodyloepiphyseal dysplasia*.

doi: 10.14341/probl201561631-35

Синдром Уолкотта—Раллисона (Wolcott—Rallison syndrome, WRS) — редкое наследственное заболевание с аутосомно-рецессивным типом наследования. Спектр основных клинических проявлений включает инсулинзависимый сахарный диабет, скелетную дисплазию, задержку роста и гепатопатию. Прогноз заболевания неблагоприятный и определяется наличием патологии печени и/или нарушением функции почек [1—5]. В литературе [5] описано около 60 генетически доказанных случаев WRS. Заболевание преимущественно распространено в странах с высоким процентом близкородственных браков: Саудовской Аравии [6], Индии, Турции, Пакистане и Северной Африке [3, 4, 6, 7]. В нашей стране пациенты с синдромом WRS до настоящего времени не описаны.

#### Клинический случай

Пациент Б., 1 год 7 мес. Ребенок от физиологической беременности, срочных родов. Масса тела при рождении 2800 г, длина тела — 52 см. Родители: троюродные брат и сестра. Семейный анамнез по заболеваниям эндокринной системы не отягощен. Два старших ребенка в семье здоровы.

#### Сведения об авторах:

Тюльпачов Анатолий Николаевич — д.м.н., зав. отд. наследственных эндокринопатий ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России;

Тихонович Юлия Викторовна — к.м.н., н.с. ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России, e-mail: yuliatikhonovich@mail.ru;

Стотикова Ольга Васильевна — зав. отд. диабетологии ФГБУ «Российская детская клиническая больница» Минздрава России;

Рубцов Петр Михайлович — д.б.н., зав. лаб. молекулярно-генетических основ эндокринной регуляции Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

© Коллектив авторов, 2015

В возрасте 1 мес у пациента на фоне полного здоровья при плановой диспансеризации была выявлена глюкозурия, уровень гликемии не определяли. В 1,5 мес появилась одышка, температура повысилась до фебрильных цифр, что было расценено как ОРВИ. При обследовании было выявлено повышение гликемии до 37 ммоль/л, кетонов крови до 4 ммоль/л (норма до 0,8 ммоль/л). рН крови составил 7,29 (норма 7,36—7,42). Был установлен диагноз «неонатальный сахарный диабет» (НСД) и назначена инсулинотерапия по базис-болюсной схеме (актрапид, протафан) в суточной дозе 0,9—1,0 ед/кг. Для дальнейшего обследования пациент был переведен в отделение диabetологии ФГБУ РДКБ Москвы.

На момент перевода отмечалась декомпенсация углеводного обмена: колебания гликемии составили 3,5—24 ммоль/л, уровень  $HbA_{1c}$  — 15,6% (норма <6%), содержание С-пептида было снижено до неопределяемых значений, аутоиммунные маркеры СД1 (IAA, ICA, GAD, IA-2) отсутствовали.

Для уточнения этиологии НСД был проведен анализ генов *KCNJ11*, *ABCC8* и *INS* с использованием секвенирования по Сэнгеру. Мутаций в указанных генах выявлено не было.

В дальнейшем пациент регулярно наблюдался в отделении диabetологии РДКБ. На протяжении всего периода наблюдения сохранялась субкомпенсация заболевания: колебания уровня  $HbA_{1c}$  составляли 7,7—9,7%, показатели физического развития ребенка соответствовали норме.

Настоящая госпитализация в возрасте 1 года 7 мес. При поступлении: рост 85 см (SDS 0,59), масса тела 12,7 кг. SDS ИМТ 0,62. Телосложение пропорциональное. Стигмы дизэмбриогенеза, изменения со стороны костно-мышечной системы обнаружены не были. Уровень  $HbA_{1c}$  составил 8,2%, изменения в биохимическом анализе крови, сосудистые осложнения СД выявлены не были (см. таблицу).

С целью дальнейшего уточнения этиологии НСД было использовано высокопроизводительное параллельное секвенирование. В экзоне 3 гена *EIF2AK3* была выявлена новая гомозиготная нонсенс-мутация Q166X, подтверждающая наличие у ребенка WRS.

#### Молекулярно-генетические исследования

Геномную ДНК выделяли из периферических лейкоцитов с использованием стандартных методов.

Секвенирование по Сэнгеру проводили на автоматическом секвенаторе ABI Genetic Analyzer 3130 («Applied Biosystems», США).

Для высокопроизводительного параллельного секвенирования использовалась библиотека ампликонов, полученная в результате мультиплексной ПЦР с использованием панели Custom Ion AmpliSeq («Life Technologies», США), включавшей праймеры

для амплификации 28 генов, ассоциированных с наследственными вариантами сахарного диабета и врожденного гиперинсулинизма. Секвенирование проводилось на секвенаторе PGM, Ion Torrent («Life Technologies», США).

#### Обсуждение

Эндоплазматический ретикулум (ЭПР) является многофункциональным компартментом, в котором, наряду с другими процессами, происходит конформационное созревание белков (фолдинг). Нарушение процессов фолдинга приводит к накоплению белков с аномальной структурой, инициирующих протеотоксический стресс ЭПР и преждевременную гибель целого ряда клеток, в том числе  $\beta$ -клеток поджелудочной железы [8, 9].

Похожий патогенетический механизм лежит в основе синдрома Вольфрама [10] и НСД в результате мутаций в гене *INS* [11].

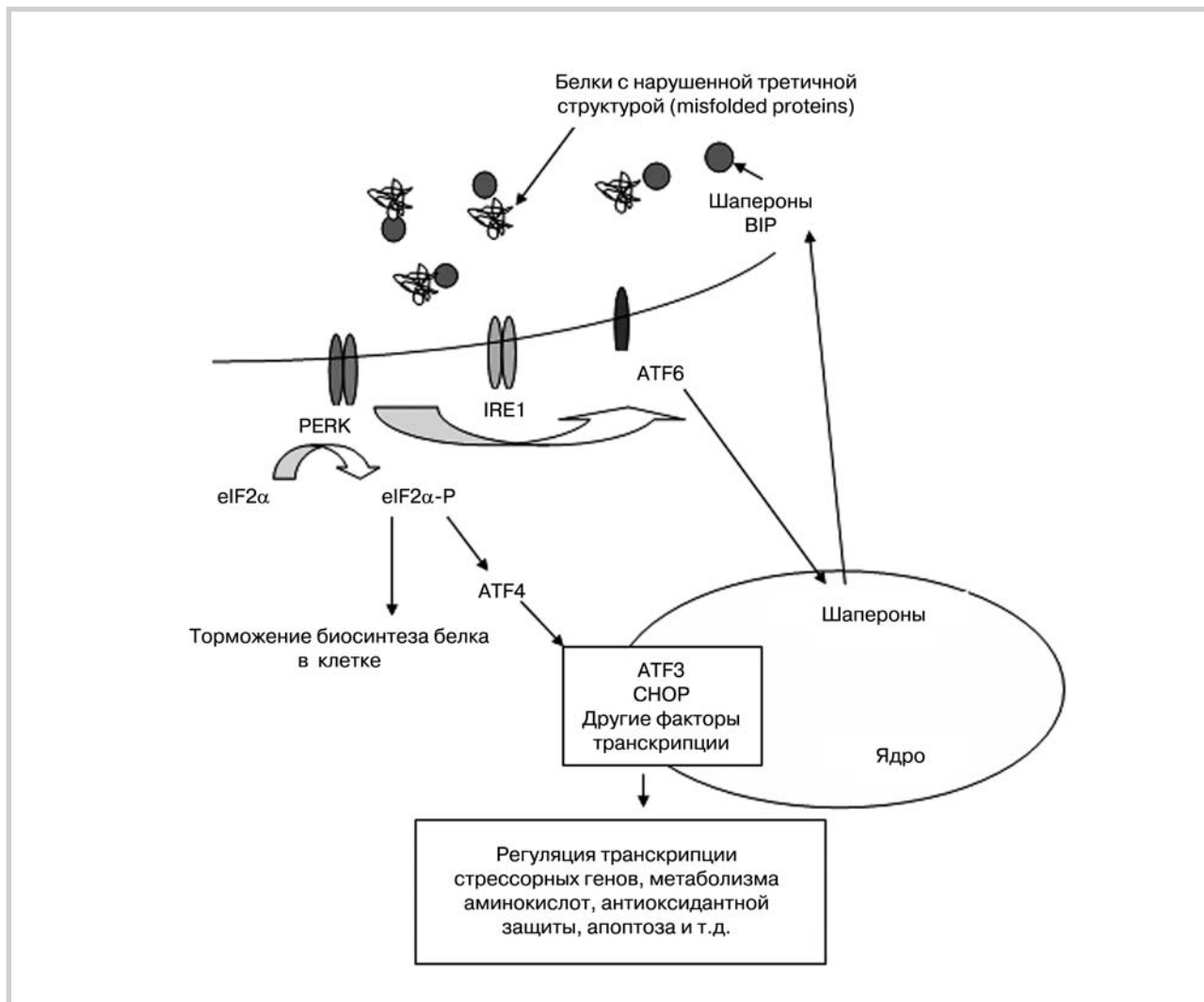
В процессе эволюции возникло множество адаптационных механизмов, позволяющих снизить концентрацию дефектных белков в люмене ЭПР, и предотвратить гибель клетки от протеотоксического стресса [8, 9]. PERK (трансмембранный белок, кодируемый геном *EIF2AK3*) играет ключевую роль в контроле трансляции белков в условиях стресса ЭПР [9, 13].

PERK состоит из сигнального пептида, регуляторного и каталитического доменов и экспрессируется преимущественно в  $\beta$ -клетках поджелудочной железы, ацинарных клетках, гепатоцитах и остеобластах [13, 14]. PERK после активации фосфорилирует  $\alpha$ -субъединицу эукариотического фактора инициации типа 2 (eIF2 $\alpha$ ), который, препятствуя перегрузке ЭПР, способствует уменьшению синтеза белков, но активирует экспрессию стрессзависимых белков ATF3, ATF4 и CHOP, контролирующих интенсивность метаболизма аминокислот, процессов окисления и клеточного апоптоза [5, 15] (см. рисунок).

Мутации в гене *EIF2AK3* приводят к функциональным дефектам системы клеточной защиты, генерализации клеточного стресса и индукции апоптоза. Кроме того, в исследованиях на животных было показано, что нарушение функции PERK в критические периоды внутриутробного и раннего неонатального периода приводит к уменьшению массы панкреатических  $\beta$ -клеток и является дополнительным фактором развития НСД [16].

Данный синдром был впервые описан Wolcott и Rallison в 1972 г. [1]. В основе заболевания лежат гомо- или компаундгетерозиготные мутации в гене *EIF2AK3*, кодирующего фермент PERK [17]. Ген *EIF2AK3* локализован на коротком плече хромосомы 2 (2p12) и состоит из 17 экзонов [17].

Основными клиническими проявлениями заболевания являются инсулинзависимый СД у детей



Система ответа на мисфолдинг (адаптировано из Julier C, Nicolino M. Wolcott—Rallison syndrome. Orphanet J Rare Dis 2010). PERK, IRE1, ATF6 — «сенсоры стресса эндоплазматического ретикула (ЭР)» — трансмембранные белки, имеющие регуляторный домен, погруженный в просвет ЭР; BiP (binding immunoglobulin protein) — один из наиболее изученных шаперонов (высокоспециализированных белков, способствующих правильному фолдингу). В физиологических условиях шапероны связаны с регуляторными доменами PERK, IRE1, ATF6. В условиях перегрузки ЭР шапероны освобождаются от связи с PERK, IRE1, ATF6, приводя к их активации; IRE1 — инозитолзависимый фермент 1-го типа. После аутофосфорилирования ограничивает трансляцию белка путем деградации ряда мРНК; eIF2α (eukaryotic initiation factor 2) — ключевого регулятора трансляции белка; ATF4 — активирующего фактора транскрипции 4, который индуцирует экспрессию генов шаперонов ЭР и факторов антиоксидантной защиты; ATF3 — активирующий фактор транскрипции 3; ATF6 — активирующий фактор транскрипции 6. Стимулирует синтез BiP; CHOP — фактор транскрипции, участвующий в регуляции апоптоза.

#### Динамика биохимических показателей крови у пациента Б.

Возраст пациента, мес	2,5	5,0	11,0	19
HbA <sub>1c</sub> , %	15,6	7,7	9,7	8,2
АЛТ, МЕ/л (норма до 50)	25	25	17	23
АСТ, МЕ/л (норма до 50)	47	47	33	36
Общий билирубин, мкмоль/л (норма 2,0—13,7)	10	4,8	3,8	6,4
Креатинин, мкмоль/л (18,0—88,0)	33	36	38	24,2
Мочевина, ммоль/л (1,7—8,3)	3,1	2,7	6,8	7,2
Общий белок, г/л (51,0—73,0)	57	61	70	67
Общий холестерин, ммоль/л (2,0—5,2)	3,31	3,55	3,7	3,99
Инсулинотерапия (ед/кг/сут)	0,8—1,0	0,8—1,0	0,9	1,0

раннего возраста, скелетная дисплазия, задержка роста и патология печени [1, 2]. СД обычно манифестирует в неонатальном периоде или в течение первых 6 мес жизни. Описаны единичные случаи дебюта заболевания в возрасте 14 [3] и 30 мес [2]. Течение СД лабильное со склонностью к тяжелым гипогликемическим состояниям в результате сопутствующего поражения печени и дефектов глюконеогенеза [13].

Задержка роста и прогрессирующие скелетные аномалии чаще всего выявляются на 2—3-м году жизни и характеризуются наличием множественной эпифизарной дисплазии [1—5]. В патологический процесс обычно вовлечены длинные трубчатые кости, позвонки и кости таза; особенно страдает груднопоясничный отдел позвоночника. Кости черепа, как правило, остаются интактными. При осмотре обращает на себя внимание укорочение туловища, наличие широкой грудной клетки с кифосколиозом в грудном отделе и лордозом в поясничном, вальгусная установка голеней, «утиная» походка [1—5]. Также характерны остеоартриты с вовлечением коленных, тазобедренных, плечевых и локтевых суставов, остеопения и частые переломы. Уровень кальция и фосфора при этом не изменяется [1—5].

Дополнительным фактором, влияющим на рост пациентов, является нарушение экспрессии ИРФ-1 в неонатальном периоде вследствие патологии печени, что может быть использовано для частичной коррекции роста с помощью инъекций ИРФ-1 [19].

Нарушение функции печени варьирует от транзитного повышения уровня трансаминаз и/или билирубина до острой печеночной недостаточности, которая нередко является причиной смерти пациентов в раннем возрасте [1—5]. Применение гепатотоксичных лекарственных препаратов, а также оперативных и диагностических манипуляций под общей анестезией должно быть четко лимитировано жизненной необходимостью.

Дополнительные клинические проявления синдрома включают нарушение экзокринной функции поджелудочной железы, задержку психоречевого развития, поражение почек, нейтропению, гипотиреоз и др. [1—5]. По мнению зарубежных исследователей [20, 21], у большинства пациентов с WRS отсутствует корреляция генотип-фенотип, что может быть связано с индивидуальной скоростью клеточного апоптоза или с влиянием внешних факторов. В частности, описаны семьи пациентов с идентичной мутацией в гене *EIF2AK3* и различными клиническими проявлениями заболевания.

Изолированное нарушение углеводного обмена, которое мы наблюдали у нашего пациента, скорее всего связано с ранним возрастом ребенка, так как описаны пациенты с мутацией Q166R, локализованной в том же кодоне, с классическим течением заболевания [22].

На сегодняшний день в гене *EIF2AK3* выявлены миссенс-, нонсенс-мутации, делеции, сплайсинг-мутации и мутации со сдвигом рамки считывания. Более 60% найденных мутаций относятся к нонсенс-мутациям и к мутациям со сдвигом рамки считывания, около 30% — к миссенс-мутациям, около 5% — к сплайсинг-мутациям [5].

Делеции, нонсенс- и сплайсинг-мутации могут встречаться по всей длине гена, тогда как миссенс-мутации локализованы преимущественно в первом киназном домене [5]. Мутация, найденная у нашего пациента, представляет собой замену глутамина на стоп-кодон в положении 166 и локализована в экзоне 3, кодирующем регуляторный домен PERK. Данная мутация ранее не была описана, однако известно, что мутации такого типа приводят к значительному дефекту синтеза белка. Кроме того, имеются сообщения о пациентах с классической формой WRS в результате мутации Q166R, расположенной в том же кодоне [22].

Прогноз заболевания неблагоприятный. Большинство пациентов погибают в возрасте от 3 до 10 лет от нарушения функции печени или от почечной недостаточности.

Наиболее перспективным методом патогенетической терапии пациентов с WRS представляется использование химических шаперонов, позволяющих увеличить устойчивость клетки в условиях стресса ЭПР [23]. В недавних работах на клеточных и животных моделях получены обнадеживающие результаты при использовании аналогов глюкагон-подобного пептида-1 в протекции  $\beta$ -клеток при стрессе ЭР [24].

## Заключение

WRS можно заподозрить у пациентов старше 2—3 лет жизни при сочетании перманентного НСД или инсулинзависимого СД у детей первых лет жизни, задержки роста, мультиэпифизарной дисплазии и нарушения функции печени.

Для диагностики у детей первых 6 мес жизни с изолированным нарушением углеводного обмена наиболее перспективным является использование высокопроизводительного параллельного секвенирования, что и было продемонстрировано нами. Использование данной методики позволяет установить диагноз в раннем возрасте до развития сопутствующей патологии, выбрать оптимальную тактику ведения пациента и рекомендовать родителям проведение пренатальной диагностики при последующих беременностях.

## Конфликт интересов отсутствует.

*Работа выполнена при частичной поддержке фонда поддержки и филантропии КАФ.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Wolcott CD, Rallison ML. Infancy-onset diabetes mellitus and multiple epiphyseal dysplasia. *The Journal of Pediatrics*. 1972;80(2):292-297. doi: 10.1016/s0022-3476(72)80596-1.
2. Senee V, Vattem KM, Delepine M, et al. Wolcott-Rallison Syndrome: Clinical, Genetic, and Functional Study of EIF2AK3 Mutations and Suggestion of Genetic Heterogeneity. *Diabetes*. 2004;53(7):1876-1883. doi: 10.2337/diabetes.53.7.1876.
3. Rubio-Cabezas O, Patch A-M, Minton JAL, et al. Wolcott-Rallison Syndrome Is the Most Common Genetic Cause of Permanent Neonatal Diabetes in Consanguineous Families. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(11):4162-4170. doi: 10.1210/jc.2009-1137.
4. Ozbek MN, Senée V, Aydemir S, et al. Wolcott-Rallison syndrome due to the same mutation (W522X) in EIF2AK3 in two unrelated families and review of the literature\*. *Pediatr Diabetes*. 2010;11(4):279-285. doi: 10.1111/j.1399-5448.2009.00591.x.
5. Julier C, Nicolino M. Wolcott-Rallison syndrome. *Orphanet J Rare Dis*. 2010;5(1):29. doi: 10.1186/1750-1172-5-29.
6. Habeb AM. Frequency and spectrum of Wolcott-Rallison syndrome in Saudi Arabia: a systematic review. *Libyan J Med*. 2013;8(0). doi: 10.3402/ljm.v8i0.21137.
7. Poovazhagi V, Sangaralingam T, Senniappan S, et al. Clinical Presentation and Long Term Outcome of 40 children with Infantile Onset Diabetes Mellitus in South India. *Indian Pediatr*. 2013;50(8):759-6.
8. Harding HP, Ron D. Endoplasmic Reticulum Stress and the Development of Diabetes: A Review. *Diabetes*. 2002;51(Supplement 3):S455-S461. doi: 10.2337/diabetes.51.2007.S455.
9. Дедов И.И., Смирнова О.М., Горелышев А.С. Стресс эндоплазматического ретикулума: цитологический сценарий патогенеза заболеваний человека. // Проблемы эндокринологии. – 2012. – Т. 58. – №5 – С. 57-65. [Dedov II, Smirnova OM, Gorelyshev AS. Stress of endoplasmic reticulum: the cytological «scenario» of pathogenesis of human diseases. *Probl Endokrinol (Mosk)*. 2012;58(5):57-65. (in Russ.)] doi: 10.14341/probl201258557-65.
10. Inoue H, Tanizawa Y, Wasson J, et al. *Nat Genet*. 1998;20(2):143-148. doi: 10.1038/2441.
11. Stoy J, Edghill EL, Flanagan SE, et al. Insulin gene mutations as a cause of permanent neonatal diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(38):15040-15044. doi: 10.1073/pnas.0707291104.
12. Feng D, Wei J, Gupta S, et al. Acute ablation of PERK results in ER dysfunctions followed by reduced insulin secretion and cell proliferation. *BMC Cell Biol*. 2009;10(1):61. doi: 10.1186/1471-2121-10-61.
13. Brickwood S, Bonthron DT, Al-Gazali LI, et al. Wolcott-Rallison syndrome: pathogenic insights into neonatal diabetes from new mutation and expression studies of EIF2AK3. *J Med Genet*. 2003;40(9):685-689. doi: 10.1136/jmg.40.9.685.
14. Zhang P, McGrath B, Li Sa, et al. The PERK Eukaryotic Initiation Factor 2 Kinase Is Required for the Development of the Skeletal System, Postnatal Growth, and the Function and Viability of the Pancreas. *Mol Cell Biol*. 2002;22(11):3864-3874. doi: 10.1128/mcb.22.11.3864-3874.2002.
15. Shi Y, Vattem KM, Sood R, et al. Identification and Characterization of Pancreatic Eukaryotic Initiation Factor 2  $\alpha$ -Subunit Kinase, PEK, Involved in Translational Control. *Mol Cell Biol*. 1998;18(12):7499-7509. doi: 10.1128/mcb.18.12.7499.
16. Zhang W, Feng D, Li Y, et al. PERK EIF2AK3 control of pancreatic  $\beta$  cell differentiation and proliferation is required for postnatal glucose homeostasis. *Cell Metabolism*. 2006;4(6):491-497. doi: 10.1016/j.cmet.2006.11.002.
17. Julier C, Delépine M, Nicolino M, et al. *Nat Genet*. 2000;25(4):406-409. doi: 10.1038/78085.
18. Hayes SE, Conner LJ, Stramm LE, Shi Y. Assignment of pancreatic eIF-2  $\alpha$  kinase (EIF2AK3) to human chromosome band 2p12 by radiation hybrid mapping and in situ hybridization. *Cytogenet Genome Res*. 1999;86(3-4):327-328. doi: 10.1159/000015328.
19. Li Y, Iida K, O'Neil J, et al. PERK eIF2 $\alpha$  Kinase Regulates Neonatal Growth by Controlling the Expression of Circulating Insulin-Like Growth Factor-I Derived from the Liver. *Endocrinology*. 2003;144(8):3505-3513. doi: 10.1210/en.2003-0236.
20. Durocher F, Faure R, Labrie Y, et al. A novel mutation in the EIF2AK3 gene with variable expressivity in two patients with Wolcott-Rallison syndrome. *Clin Genet*. 2006;70(1):34-38. doi: 10.1111/j.1399-0004.2006.00632.x.
21. Al-Shawi M, Al Mutair A, Ellard S, Habeb AM. Variable phenotype in five patients with Wolcott-Rallison syndrome due to the same EIF2AK3 (c.1259delA) mutation. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2013;26(7-8). doi: 10.1515/jpem-2012-0071.
22. Behnam B, Shakiba M, Ahani A, Razzaghy Azar M. Recurrent Hepatitis in Two Iranian Children: A Novel (Q166R) Mutation in EIF2AK3 Leading to Wolcott-Rallison Syndrome. *Hepatitis Monthly*. 2013;13(6). doi: 10.5812/hepatmon.10124.
23. Hotamisligil GS. Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic Disease. *Cell*. 2010;140(6):900-917. doi: 10.1016/j.cell.2010.02.034.
24. Cunha DA, Ladriere L, Ortis F, et al. Glucagon-Like Peptide-1 Agonists Protect Pancreatic  $\beta$ -Cells From Lipotoxic Endoplasmic Reticulum Stress Through Upregulation of BiP and JunB. *Diabetes*. 2009;58(12):2851-2862. doi: 10.2337/db09-0685.