Роль молекулярно-генетических методов исследования в диагностике синдрома МакКьюна—Олбрайта—Брайцева

© Н.В. Маказан, Е.М. Орлова, А.А. Колодкина, М.А. Карева, Н.Ю. Калинченко, Е.В. Васильев, А.Н. Тюльпаков, В.А. Петеркова

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России, Москва, Россия

Синдром МакКьюна—Олбрайта—Брайцева (МОБ) — редкое генетическое заболевание, в основе которого лежат соматические мутации в гене *GNAS.* Клинические признаки заболевания включают пятна цвета «кофе с молоком», фиброзную дисплазию и гиперфункцию эндокринных желез. Соматический характер мутации определяет вариабельность проявлений синдрома: от легких форм с минимумом проявлений до тяжелых состояний с агрессивным течением. Потенциальная мультикомпонентность синдрома МОБ обусловливает необходимость динамического наблюдения, включающего регулярный скрининг на возможные компоненты заболевания. Поэтому дополнительные уточняющие методы диагностики синдрома МОБ, особенно при его стертых вариантах, должны способствовать определению тактики ведения пациентов и частоты наблюдения и/или полному исключению диагноза. Одним из таких методов может служить молекулярно-генетическое подтверждение диагноза.

Цель исследования — определить ценность высокопроизводительного параллельного секвенирования (Next generation sequencing — NGS) и полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с использованием технологии детекции соматических мутаций TaqMan (competitive allele-specific TaqMan PCR, CAST-PCR) в диагностике соматических мутаций R201C и R201H в гене *GNAS* по ДНК, полученной из периферической крови.

Материал и методы. В исследование были включены пациенты с диагнозом синдром МОБ и пациенты с подозрением на него. Молекулярно-генетическое исследование мутаций R201C и R201H в гене *GNAS* по ДНК, выделенной из лейкоцитов периферической крови, выполнялось методами высокопроизводительного параллельного секвенирования (Next generation sequencing — NGS) и ПЦР в режиме реального времени с использованием технологии детекции соматических мутаций TaqMan (competitive allele-specific TaqMan PCR, CAST-PCR). На основании клинических данных пациенты были разделены на группы в зависимости от тяжести течения заболевания и от числа проявлений МОБ. Оценка результатов проводилась при сравнении частоты выявляемости молекулярно-генетических дефектов в сформированных группах пациентов.

Результаты. Молекулярно-генетическое исследование проведено 39 детям с синдромом МОБ и 6 детям, у которых диагноз МОБ был под сомнением. Мутации гена *GNAS* R201C и R201H найдены у 16 (41%) из 39 пациентов с МОБ тяжелой и средней степени тяжести. У остальных пациентов с синдромом МОБ и у пациентов с подозрением на МОБ мутации выявлены не были.

Заключение. Методы NGS и CAST-PCR позволяют обнаруживать наличие мутантных аллелей R201C и R201H *GNAS* в образцах ДНК, полученной из крови, в случае тяжелого и средней тяжести синдрома МОБ, но не могут быть рекомендованы для диагностики синдрома МОБ по образцам периферической крови у детей со стертыми проявлениями синдрома и подозрением на этот диагноз.

Ключевые слова: синдром МакКьюна—Олбрайта—Брайцева, соматические мутации, высокопроизводительное параллельное секвенирование, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, TaqMan.

The role of molecular genetic methods in the diagnosis of McCune—Albright syndrome

© N.V. Makazan, E.M. Orlova, A.A. Kolodkina, M.A. Kareva, N.Yu. Kalinchenko, E.V. Vasilyev, A.N. Tiulpakov, V.A. Peterkova

Endocrinology Research Centre, Moscow, Russia

McCune-Albright syndrome (MAS) is a rare genetic disorder which is caused by somatic mutations in the *GNAS* gene. Clinical symptoms of MAS include café-au-lait skin pigmentation, fibrous dysplasia, and autonomous endocrine hyperfunction. Somatic character of the gene defects determines wide variety of syndrome manifestations, from mild forms with minimum presentation to severe conditions with aggressive course. Potential multicomponent form of the MAS syndrome necessitates the dynamic monitoring, including regular screening for possible components of the disease. Therefore, additional methods specifying the diagnosis of MAS syndrome, especially of its suppressed forms, should facilitate selection of patient management strategy and monitoring rate and/or complete exclusion of the diagnosis. Molecular genetic verification of the diagnosis may be one of these methods.

Objective — the study was aimed at evaluating massive parallel sequencing (next generation sequencing, NGS) and real-time polymerase chain reaction using the TaqMan technique for detection of somatic mutations (competitive allele-specific TaqMan PCR, CAST-PCR) in the diagnosis of somatic mutations R201C and R201H in the *GNAS* gene based on DNA obtained from the peripheral blood.

Material and methods. The study included patients diagnosed with and suspected for MAS syndrome. Molecular genetic testing of R201C and R201H mutations in the *GNAS* gene based on DNA extracted from peripheral blood leukocytes was carried out by Next generation sequencing (NGS) and real-time polymerase chain reaction methods using the TaqMan technique for detection of somatic mutations (competitive allele-specific TaqMan PCR, CAST-PCR). Based on clinical data, patients were divided into groups depending on the severity of the disease and the number of MAS manifestations. The results were evaluated by comparing the rate of detected molecular genetic defects in the formed groups of patients.

Results. Molecular genetic study included 39 children with MAS syndrome and 6 children with suspected MAS. R201C and R201H mutations in *GNAS* gene were detected in 16 patients with severe to moderate MAS 16 (41%) 39. No mutations were detected in other MAS patients and patients with suspected MAS.

Copyright © 2017 by the MediaSphere
Licensee: CC BY-NC-ND
doi: 10.14341/probl2017636360-368

Проблемы эндокринологии 2017;63(6):360-368
Problems of Endocrinology 2017;63(6):360-368

Conclusion. NGS and CAST-PCR methods can detect the presence of mutant alleles R201C and R201H of *GNAS* gene in DNA samples obtained from the blood in the case of severe to moderate MAS syndrome, but they cannot be recommended for MAS diagnosis based on the peripheral blood samples in children with mild signs of the syndrome or suspected diagnosis.

Keywords: McCune—Albright syndrome, somatic mutations, massive parallel sequencing, real-time polymerase chain reaction.

Синдром МакКьюна—Олбрайта—Брайцева (OMIM 174800) — редкое мультикомпонентное генетическое заболевание. Оно названо в честь врачей, впервые описавших его компоненты: в 1937 г. F. Albright и соавт. [1] и D. McCune и соавт. [2] описали пациентов с пятнами цвета «кофе с молоком», деформациями костей и периферическим преждевременным половым развитием. За 10 лет до этого русским хирургом Брайцевым было впервые дано подробное описание фиброзной дисплазии [3], в связи с чем в русской транскрипции заболевание носит и его фамилию. В дальнейшем было установлено, что при синдроме МОБ эндокринная патология не ограничивается гиперфункцией гонад, а может быть представлена широким спектром проявлений, включая гиперкортицизм, гиперсекрецию СТГ, тиреотоксикоз и гипофосфатемический рахит. Соматический характер мутаций предполагался на основании спорадического характера заболевания и мозаицизма клинических проявлений, таких как распределение пятен цвета «кофе с молоком» по линиям Блашко, отражающее наличие двух клеточных популяций — с мутацией и без таковой [4]. Открытие функций G-белка и генов, кодирующих его субъединицы, позволило выявить причину заболевания: активирующие мутации в гене *GNAS* (OMIM 139320) обусловливают конститутивную активность стимулирующей субъединицы G-белка (Gas), что проявляется автономной гиперфункцией органов и ведет к развитию мультикомплексного заболевания.

Учитывая соматический характер мутаций, детекция их стандартной методикой полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим секвенированием по Сэнгеру возможна в пораженных тканях, с высоким содержанием мутантных аллелей, тогда как эффективность этой методики при исследовании образцов ДНК периферической крови крайне мала [5]. В большинстве случаев классическая триада клинических признаков не оставляет сомнений в диагнозе, но при стертых формах, когда наличие синдрома МОБ сомнительно, эффективные методы детекции соматических мутаций *GNAS* могли бы значительно упростить дифференциальную диагностику. Метод высокопроизводительного параллельного секвенирования (NGS), позволяющий анализировать последовательность ДНК в образцах с малым ее количеством, активно используется при детекции соматических мутаций [6, 7]. Метод ПЦР в режиме реального времени с использованием технологии детекции соматических мутаций TaqMan (competitive allele-specific TaqMan PCR) также оказался успешным при исследовании соматических мутаций по образцам с низким содержанием мутантных аллелей [8, 9]. Исходя из этого, представлялось возможным использование данных методов для поиска соматических мутаций в образцах ДНК периферической крови и пациентов с синдромом МОБ или с подозрением на него. Учитывая данные о сравнительной частоте встречаемости соматических мутаций в 8 экзоне R201H и R201C и 9 экзоне Q227L гена *GNAS*, молекулярно-генетическое исследование было сосредоточено на детекции мутаций в «горячей точке» R201 этого гена [10, 13].

Цель исследования — разработка эффективных молекулярно-генетических методов верификации диагноза синдром МОБ.

Материал и методы

Проспективное одномоментное исследование включало следующие этапы: набор образцов периферической крови пациентов с синдромом МОБ и пациентов с подозрением на этот синдром; подготовку образцов к исследованию (выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови пациентов); проведение эксперимента — детекция соматических мутаций R201C и R201H в гене *GNAS* по ДНК, полученной из периферической крови методами высокопроизводительного параллельного секвенирования (Next generation sequencing — NGS) и ПЦР в режиме реального времени с использованием технологии детекции соматических мутаций TaqMan (competitive allele-specific TaqMan PCR, CAST-PCR); анализ полученных результатов и оценку эффективности примененных методов исследования.

Критерием включения в группу пациентов с синдромом МОБ являлось наличие двух из трех классических признаков этого синдрома: пятна цвета «кофе с молоком» географической формы, эндокринная гиперфункция, фиброзная дисплазия. Критерии исключения: отсутствие согласия со стороны пациентов и/или родителей/официальных представителей, несоответствие качества полученных образцов ДНК необходимым для выполнения эксперимента требованиям. В группу пациентов с подозрением на синдром МОБ были включены пациенты с одним его классическим признаком — девочки с эпизодами влагалищных кровотечений и

 DOI: http://dx.doi.org/10.14341/probl2017636360-368

пациенты с фиброзной дисплазией в отсутствие других проявлений. Критерий исключения из данной группы: центральное преждевременное половое развитие (ППР).

Эксперимент выполнен в лаборатории молекулярно-генетических исследований, оснащенной необходимым оборудованием и условиями для выполнения следующих этапов: выделение ДНК из образцов периферической крови, определение концентрации ДНК, хранение образцов крови и ДНК, проведение ПЦР, секвенирования, компьютерной обработки и анализа данных.

Образцы для исследования получали методом венепункции с забором проб крови в пробирки с ЭДТА.

В качестве конечных точек исследования оценивали наличие/отсутствие мутантных аллелей в образцах периферической крови пациентов с синдромом МОБ, исследованных с помощью вышеописанных методик.

Выделение ДНК. Выделение ДНК из образцов периферической крови выполнено набором PureLink Genomic DNA Mini Kit (Life Technologies K1820). Оценка концентрации ДНК в полученных образцах проводилась с помощью флуориметра Qubit 3.0 («Life Technologies», США) и спектрофотометра с регистрацией отношения поглощения при длинах волн 260 и 280 нм. Образец считался чистым, если отношение значений 260/280 нм превышало 1,7.

Высокопроизводительное параллельное секвенирование (Next generation sequencing — NGS) выполнено на платформе PGM (Personal Genome Machine) Ion Torrent («Life Technologies», США). После выделения геномной ДНК проводилась подготовка ДНК-библиотек. Методом ПЦР выполнялась амплификация геномной ДНК, охватывающей исследуемую последовательность локуса *GNAS* (chr20:57484398-57484647; hg19), включая нуклеотиды от 598 to 711 (начиная со стартового ATG кодона). Далее ПЦР-продукты ограничивали (фланкировали) двумя адаптерами, один из которых предназначался для гибридизации на микросферах, другой был комплементарен секвенирующему праймеру. Полученные фрагменты библиотек амплифицировались на микросферах методом эмульсионной ПЦР, что позволяло получать клоны единичных фрагментов ДНК на каждой микросфере. Затем микросферы погружались в лунки полупроводникового микрочипа, где расшифровывалась последовательность ДНК (секвенирование). Анализ результатов проводился с помощью программ Torrent Suite (Ion Torrent). Для определения мутаций R201C и R201H анализировали глубину прочтений нормальных и мутантных нуклеотидов в положениях chr20:57484420 и chr20:57484421 соответственно с помощью программы VCFtools. Координаты соответствуют референсному геному человека hg19.

Детекция соматических мутаций осуществлялась с помощью ПЦР в режиме реального времени (real-time) с использованием технологии TaqMan, «Life Technologies, Inc» (CAST-TaqMan PCR). В исследовании использовались аллель-специфические ДНК-зонды GNAS_27887_mu для детекции R201C (c.601C>T, p. Arg201Cys) и GNAS_27895_mu для детекции R201H (c.602G>A, p. Arg201 His), GNAS_rf («Life Technologies», США). Приготовление реакционных смесей (master-mixes) проводилось согласно протоколу производителя при увеличенном количестве исследуемой ДНК (рекомендованное производителем количество ДНК для смеси — от 10 до 20 нг, использованное количество ДНК — 50 нг); пробы распределяли на 96-луночной реакционной плашке для real-time-ПЦР-амплификатора StepOnePlus. Условия для амплификации были установлены следующие: 95 °C в течение 10 мин, затем 5 циклов при температуре 92 °C по 15 с каждый, затем 1 мин при температуре 58 °C, 40 циклов по 15 с при температуре 92 °C и затем 1 мин при 60 °C. Флуоресцентный сигнал регистрировался при последнем цикле амплификации и анализировался с помощью приложения Mutation Detector software v. 2.0 («Life Technologies», США) путем определения разницы в пороговых уровнях флуоресценции от проб с мутантной и референсной последовательностями *GNAS* (dCt = Ct mut — Ct ref). В соответствии с расчетами значения ΔCT, проведенными в экспериментах производителем технологии TaqMan, образец считался содержащим мутацию при ΔCT (дельта порогового цикла) со значением менее 9,96.

Результаты NGS регистрировались и анализировались с помощью программы Torrent Suite (Ion Torrent Suite, «Life Technologies», США), а результаты CAST-TaqMan-PCR — с помощью программы Mutation Detector software v. 2.0 («Life Technologies», США). Эффективность применяемых методик оценивали по количеству положительных результатов в группах, сформированных на основании тяжести заболевания.

В группу пациентов с подозрением на синдром МОБ были включены пациенты с одним классическим признаком этого синдрома — девочки с эпизодами кровотечений при исключенном центральном генезе ППР и пациенты с фиброзной дисплазией в отсутствие других проявлений.

У пациентов с синдромом МОБ определяли тяжесть заболевания в зависимости от проявлений. Было применено два подхода для разделения пациентов на группы. Один из них основывался на тяжести проявлений, второй — на количестве имевшихся проявлений.

Степень тяжести определяли по специально разработанной шкале. Каждый признак оценивался в баллах от 1 до 5. Тяжелая степень устанавливалась при общей сумме баллов — 15 и более, средняя сте-

пень тяжести — 5—15 баллов, легкая степень — менее 5 баллов **(табл. 1)**.

При делении в зависимости от количества проявлений были сформированы три группы: A — пациенты с классической триадой и гиперфункцией более чем одной эндокринной железы или дополнительным поражением других органов (с участием Gas — тахикардия при исключенном тиреотоксикозе); B — пациенты с классической триадой, включающей поражение одного эндокринного органа; C — пациенты с двумя признаками синдрома МОБ.

У всех пациентов или их законных представителей было получено информированное согласие на участие в исследовании и публикации его результатов. Этическая экспертиза проведена в локальном этическом комитете ФГБУ «Эндокринологический научный центр». Протокол ЛЭК от 22.10.14 г.

Размер выборки предварительно не рассчитывался. Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием пакета статистических программ Statistica 10. Для обобщения и сравнения данных, полученных в рамках выборочного исследования, использовались методы описательной непараметрической статистики.

Результаты

Обследованы 39 пациентов с синдромом МОБ и 6 детей с диагнозом синдром МОБ, который был под сомнением (всего 10 мальчиков, 35 девочек). Мутации в гене *GNAS* R201C и R201H найдены у 16 (41%) из 39 пациентов с синдромом МОБ. Мутация R201H при применении метода CAST-TaqMan-real time PCR была выявлена у 11 пациентов с синдромом МОБ и подтверждена методом NGS у 6 пациентов; мутация R201C была выявлена у 6 пациентов обоими методами. У всех детей с подозрением на синдром МОБ мутации выявлены не были. Результаты молекулярно-генетического исследования представлены в **табл. 2**.

Клинические проявления синдрома у пациентов варьировали от легких форм до выраженных мультикомпонентных состояний тяжелого течения.

При оценке частоты выявляемости мутаций по группам было установлено, что с помощью примененных методов молекулярно-генетического анализа мутации R201H и R201C в *GNAS* выявлялись практически у всех пациентов с тяжелым течением (88%) и более чем у половины пациентов со средней тяжестью течения (53%). При разделении пациентов на группы в зависимости от количества имеющихся проявлений не было получено значительной разницы между группами A и B: 64% мутаций найдено у пациентов с мультигормональной гиперфункцией, в 50% случаев выявлены мутации у пациентов с классической триадой. Данные о результатах исследования среди разных групп пациентов представлены в **табл. 3 и 4**.

Обсуждение

Активация G-белка, происходящая в норме при связывании лиганда с рецептором, ведет к замене гуанозиндифосфата (ГТФ) в комплексе G-белка $\beta\gamma\alpha_s$-ГДФ на ГТФ. Комплекс Gas-ГТФ запускает каскад внутриклеточного сигнала от рецептора к ядру клетки. После активации следующего звена каскада (аденилатциклазы) Gαs-ГТФ вновь заменяется на неактивный комплекс $\beta\gamma\alpha_s$-ГДФ, причем ферментом, обладающим ГТФ-азной активностью, является сама субъединица Gαs [10]. C. Landis и соавт. [11] впервые показали, что замена аргинина на цистеин или гистидин в позиции 201 *GNAS* ведет к потере этой ГТФазной активности. К такому же эффекту приводит замена глицина в 227 положении *GNAS* на лейцин, аргинин, лизин или гистидин, хотя она описана только при изолированных вариантах фиброзной дисплазии [12—14]. В результате возникает конститутивная активация Gas с неконтролируемым образованием внутриклеточного цАМФ, проявляющаяся автономной гиперфункцией органов-мишеней.

Определение соматических мутаций *GNAS* в образцах пораженных органов у пациентов с синдромом МОБ ведется уже более 25 лет [15]. За эти годы были установлены «горячие точки» в последовательности *GNAS*, обусловливающие синдром МОБ, и появилась возможность использования молекулярно-генетического исследования для подтверждения диагноза, хотя, по-прежнему, наиболее достоверным материалом для исследования остаются фрагменты пораженных тканей, где детекция мутаций не представляет затруднений в силу большой концентрации мутантных аллелей. В течение последних 10 лет разрабатываются методы, позволяющие выявлять мутации в *GNAS* при исследовании ДНК периферической крови. Один из первых таких методов был разработан G. Candeliere и соавт. [16], он заключался в проведении гнездовой ПЦР с использованием специфических эндонуклеаз, препятствующих амплификации с аллелей дикого типа.

В нашем исследовании были использованы технологии, успешно применяющиеся для детекции соматических мутаций при злокачественных образованиях. Новые технологии усовершенствовали метод Сэнгера, позволив секвенировать одновременно тысячи молекул ДНК и тем самым сделать доступным детекцию мутаций при малой концентрации мутантных аллелей в образце. Существуют данные об эффективном применении NGS для детекции мутаций по ДНК периферической крови у пациентов с синдромом МОБ на небольших группах пациентов [17]. Аллельспецифическое секвениро-

 DOI: http://dx.doi.org/10.14341/probl2017636360-368

Таблица 1. **Критерии тяжести течения синдрома МОБ**

Признак	Описание признака	Балл
Наличие пятен цвета «кофе с молоком»	Пятна цвета «кофе с молоком» неправильных очертаний («географические»), любой локализации и размеров	1
Фиброзная дисплазия (ФД)	ФД без деформаций, переломов и кистозных очагов, угрожаемых по переломам	1
	ФД с кистозными очагами в местах, угрожаемых по переломам	2
	Переломы или деформации после 6 лет	3
	Переломы или деформации 3—6 лет	4
	Переломы до 3 лет	5
	ФД черепа с деформациями, но без сужения каналов зрительных нервов	2
	ФД черепа с деформациями черепа и сужением каналов зрительных нервов, без нарушения носового дыхания, без значимых эстетических дефектов	3
	ФД черепа с деформациями черепа и сужением каналов зрительных нервов с нарушением функции дыхания, слуха, эстетическими дефектами, без нарушения зрительной функции	4
	ФД черепа с сужением каналов зрительных нервов с нарушением зрительной функции	5
Гиперкортицизм	Наличие синдрома Кушинга	5
	Течение синдрома Кушинга потребовало адреналэктомии	5
Гиперсекреция СТГ	Гиперсекреция СТГ с SDS ИФР1 >1,5 в сочетании с ФД черепа, терапия аналогами сандостатина неэффективна и/или прогрессирующее увеличение аденомы гипофиза	5
	Гиперсекреция СТГ с SDS ИФР1 >1,5 в сочетании с ФД черепа, требуется увеличение дозы аналога сандостатина, и/или наличие аденомы гипофиза	4
	Гиперсекреция СТГ с SDS ИФР1 >1,5 с очагами ФД черепа, эффективно лечение аналогами соматостатина в минимальной дозе 10 мг/мес	3
	Гиперсекреция СТГ с SDS ИФР1 > 1,5 без очагов ФД черепа. Терапия аналогами сандостатина не требуется	2
	Гиперсекреция СТГ без очагов ФД с SDS ИФР <1,5. Терапия аналогами сандостатина не требуется	
Патология щитовидной железы	Тиреоидэктомия, выполненная в связи с тиреотоксикозом, не поддающимся медикаментозному лечению, либо в связи с прогрессирующим зобом	5
	Тиреотоксикоз, медикаментозно компенсированный	4
	Выраженные морфологические изменения щитовидной железы без нарушения функции, прогрессирующие	3
	Выраженные морфологические изменения щитовидной железы без нарушения функции, не прогрессирующие или при неизвестной степени прогрессии	2
	Начальные изменения щитовидной железы (нарушения эхоструктуры, эхогенности без узловых образований)	1
Фосфорный обмен	Гипофосфатемия, гиперэкскреция фосфора с мочой с рентгенологическими признаками дефицита фосфора	4
	Выраженная гипофосфатемия, гиперэкскреция фосфора с мочой без рентгенологических признаков дефицита фосфора	3
	Умеренная гипофосфатемия, гиперэкскреция фосфора с мочой без рентгенологических признаков дефицита фосфора	2
Периферическая ППР (пППР)	пППР с персистирующими кистами, потребовавшими овари- или цистэктомии — 5 баллов	5
	пППР с прогрессирующим ускорением роста и костного возраста	4
	пППР с опережением роста более 2 SDS без ускорения роста и костного возраста в динамике	3
	пППР без выраженного ускорения роста и костного возраста	2
Макроорхидизм	Макроорхидизм с микролитиазом и/или кистами тестикул	3
	Макроорхидизм без нарушения структуры тестикул	2
Тахикардия	Тахикардия с выраженными морфофункциональными нарушениями сердечно-сосудистой системы (гипертрофия сердца, клинически значимые нарушения гемодинамики)	4
	Тахикардия с прогрессирующими морфофункциональными нарушениями сердечно-сосудистой системы (гипертрофия сердца, клинически незначимые нарушения гемодинамики)	3
	Тахикардия с начальными морфофункциональными нарушениями сердечно-сосудистой системы (начальные признаки гипертрофии ЛЖ без нарушений гемодинамики)	2
	Тахикардия без морфофункциональных нарушений сердечно-сосудистой системы	1

Таблица 2. **Результаты молекулярно-генетического исследования**

R201H			R201C		
deltaCT	RealTime	NGS	deltaCT	RealTime	NGS
10,85	—	—	7,18	+	+
11,42	—	—	15,01	—	—
8,95	—	—	14,87	—	—
10,53	—	—	11,96	—	—
4,32	+	+	7,31	—	—
5,53	+	+	17,51	—	—
20,16	—	—	14,58	—	—
19,20	—	—	14,86	—	—
12,70	—	—	14,83	—	—
13,19	—	—	21,87	—	—
13,20	—	—	14,72	—	—
10,17	—	—	17,69	—	?
11,41	—	—	18,39	—	?
13,28	—	—	16,52	—	—
12,76	–	–	9,67	+	+
14,61	—	—	20,67	—	—
8,26	+	+	15,14	—	—
13,45	—	—	23,32	—	—
5,00	+	+	16,13	—	—
14,37	—	—	14,63	—	—
18,07	—	—	15,07	—	—
6,93	+	+	20,01	—	—
15,61	—	—	20,74	—	—
6,53	+	+	17,56	—	—
18,99	—	—	8,10	+	+
17,62	—	—	20,08	—	—
13,82	—	—	14,02	—	—
11,47	—	—	7,75	+	+
12,36	—	—	10,77	+	+
10,27	—	—	14,71	—	—
8,56	+	Не проведено	15,64	—	—
10,01	—	—	21,13	—	—
8,51	+	Не проведено	20,60	—	—
7,29	+	Не проведено	14,30	—	—
18,94	—	—	16,35	—	—
11,36	—	—	14,96	—	—
3,43	+	Не проведено	17,95	—	—
11,53	—	—	18,12	—	—
12,39	—	—	15,32	—	—
7,33	+	Не проведено	15,72	—	—
10,94	—	—	12,61	—	—
14,37	—	—	16,31	—	—
14,70	—	—	17,71	—	—
17,83	—	—	19,91	—	—
15,04	—	—	16,36	—	—
13,48	—	—	16,85	—	—
15,88	—	—	15,41	—	—
12,87	—	—	15,91	—	—
16,61	—	—	16,90	—	—
12,54	—	—	15,34	—	—
15,50	—	—	19,78	—	—
12,33	—	—	20,15	—	—
14,46			16,58		

 DOI: http://dx.doi.org/10.14341/probl2017636360-368

***Таблица 3*. Количественные данные о пациентах с проведенным молекулярно-генетическим исследованием, разделенных на группы по степени тяжести**

Степень тяжести	Число пациентов с данной формой течения заболевания	Число пациентов с найденной мутацией, абс. (%)
Тяжелая	8	7 (88) из 8
Средней тяжести	17	9 (53) из 17
Легкой степени	1	0 (0)
Синдром МОБ под сомнением	6	0 (0)

***Таблица 4*. Количественные данные о пациентах с проведенным молекулярно-генетическим исследованием, разделенных по группам в зависимости от количества имеющихся проявлений**

Степень тяжести	Число пациентов с данной формой заболевания	Число пациентов с найденной мутацией с указанием процентов от общего числа пациентов, абс. (%)
А — пациенты с классической триадой и мультигормональной гиперфункцией	14	9 (64) из 14
В — пациенты с классической триадой (пятна цвета «кофе с молоком», ФД, поражение одного органа эндокринной системы)	14	7 (50) из 14
С — пациенты с двумя признаками синдрома МОБ	11	0 (0)
Синдром МОБ под сомнением	6	0 (0)

вание с применением технологий TaqMan, препятствуя амплификации аллелей дикого типа и обеспечивая увеличение копий только мутантных аллелей, также позволяет выявлять мутации при их низкой концентрации в образце, что позволило включить в эксперимент и этот метод.

Мы оценивали возможность применения метода для диагностики синдрома МОБ в сомнительных случаях, когда критериев для постановки диагноза недостаточно. Поэтому представлял интерес анализ выявляемости мутаций по группам в зависимости от тяжести течения заболевания. С этой целью была разработана балльная система оценки тяжести состояния, учитывающая все проявления синдрома. Полученные результаты свидетельствуют об эффективности примененных методов в случаях тяжелого течения у 7 (88%) из 8, когда имеется не просто мультикомпонентность, но интенсивная гиперфункция эндокринных желез, приводящая к инвалидизации пациента, либо имеет место высокий риск жизнеугрожающих осложнений. Очевидно, что мутации были выявлены у пациентов с достаточно высоким содержанием мутантных аллелей в образцах ДНК периферической крови, причем их содержание не зависело от числа вовлеченных в процесс органов. Этому соответствуют результаты проведенного исследования: у 9 (64%) из 14 выявляемости среди пациентов с мультиэндокринными формами в составе триады, у 7 (50%) из 14 среди пациентов с моноэндокринной гиперфункцией в составе триады, а также данные S. Narumi и соавт. [17] об отсутствии связи между количеством имеющихся признаков синдрома МОБ и частотой выявляемости мутаций.

Несмотря на принципиальную эффективность примененных методов, необходимо дальнейшее их совершенствование для улучшения результатов детекции соматических мутаций. При проведении NGS повысить чувствительность метода способно использование пептид-нуклеиновых кислот (PNA), препятствующих амплификации с аллелей дикого типа, хотя в целом порог чувствительности повышается незначительно: наименьший процент содержания мутантных аллелей в образце для NGS — 0,03%, тогда как для NGS-PNA — 0,01% [17]. Повысить эффективность аллель-специфического TaqMan PCR при детекции мутаций у пациентов с синдромом МОБ может комбинация с COLD-ПЦР (co-amplification at lower denaturation temperature-PCR), при которой селективная амплификация мутантных аллелей становится возможной за счет денатурации при более низкой температуре [18]. Методы различаются в подходах, в типе используемой ПЦР, но в целом все технологии по детекции соматических мутаций в образцах с низким содержанием мутантных аллелей основаны на принципе подавления амплификации с аллелей дикого типа и увеличения мутантных копий. Только в этом случае выявление мутации может быть успешным.

Заключение

Молекулярно-генетическая верификация соматических мутаций при исследовании ДНК перифе-

рической крови затруднительна в силу низкой концентрации мутантных аллелей вне пораженных органов. Тестирование различных методов на больших группах пациентов позволяет прогнозировать их полезность в качестве вспомогательного диагностического инструмента. Использованные ранее методы свидетельствуют об эффективности в 70—100%, однако исследования отличались малой выборкой пациентов (до 16 образцов ДНК периферической крови) [9, 16, 17]. Наше исследование выполнено на большей группе пациентов, и эффективность методов детекции оценивали в зависимости от тяжести течения и количества признаков заболевания. Методы высокопроизводительного параллельного секвенирования (Next generation sequencing — NGS) и ПЦР-real-time с использованием технологии детекции соматических мутаций TaqMan (CAST-PCR) позволяют обнаруживать наличие мутантных аллелей R201C и R201H *GNAS* в образцах ДНК, полученной из крови, в случае тяжелого и средней тяжести синдрома МОБ. Однако эти методы не могут быть рекомендованы для диагностики синдрома МОБ по образцам периферической крови у детей со стертыми проявлениями и подозрением на этот диагноз. Требуется дальнейшее изучение возможностей повышения чувствительности детекции соматических мутаций по образцам ДНК периферической крови.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке фонда «КАФ».

Конфликт интересов. Исследование является частью диссертационной работы. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования — Н.В. Маказан, Е.М. Орлова, М.А. Карева, В.А. Петеркова, А.Н. Тюльпаков.

Разработка шкалы оценки тяжести течения болезни — Н.В. Маказан.

Предоставление материалов исследования — Н.В. Маказан, Е.М. Орлова, М.А. Карева, Н.Ю. Калинченко, А.А. Колодкина.

Сбор материалов — Н.В. Маказан.

Проведение молекулярно-генетического исследования — Н.В. Маказан, Е.В. Васильев, А.Н. Тюльпаков.

Анализ полученных данных, написание текста — Н.В. Маказан.

Редакция текста, внесение ценных замечаний — Е.В. Васильев, Е.М. Орлова, Н.Ю. Калинченко, М.А. Карева, А.Н. Тюльпаков, В.А. Петеркова.

ЛИТЕРАТУРА | REFERENCES

1. Albright F, Butler AM, Hampton AO, Smith P. Syndrome characterized by osteitis fibrosa disseminata, areas of pigmentation and endocrine dysfunction, with precocious puberty in females. *N Engl J Med*. 1937;216(17):727-746. doi: 10.1056/nejm193704292161701
2. McCune DJ, Bruch H. Osteodystrophia fibrosa: report of a case in which the condition was combined with precocious puberty, pathologic pigmentation of the skin and hyperthyroidism, with a review of the literature. *Am J Dis Child*. 1937;54(4):806-848. doi: 10.1001/archpedi.1937.01980040110009
3. Брайцев Б.Р. Osteodystrophia fibrosa localisata. *Вестник хирургии и пограничных областей*. — 1928. — №1. — С. 301-315. [Braytsev BR. Osteodystrophia fibrosa localisata. *Vestnik khirurgii i pogranicnyh oblastej*. 1928;(1):301-315. (In Russ.)].
4. Happle R. The McCune—Albright syndrome: a lethal gene surviving by mosaicism. *Clin Genet*. 2008;29(4):321-324. doi: 10.1111/j.1399-0004.1986.tb01261.x
5. Angelousi A, Fencl F, Faucz FR, et al. McCune Albright syndrome and bilateral adrenal hyperplasia: the GNAS mutation may only be present in adrenal tissue. *Hormones (Athens)*. 2015;14(3):447-450. doi: 10.14310/horm.2002.1578
6. Meyerson M, Gabriel S, Getz G. Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing. *Nat Rev Genet*. 2010;11(10):685-696. doi: 10.1038/nrg2841
7. Bohers E, Viailly PJ, Dubois S, et al. Somatic mutations of cell-free circulating DNA detected by next-generation sequencing reflect the genetic changes in both germinal center B-cell-like and activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphomas at the time of diagnosis. *Haematologica*. 2015;100(7):e280-e284. doi: 10.3324/haematol.2015.123612
8. Roma C, Esposito C, Rachiglio AM, et al. Detection of EGFR mutations by TaqMan mutation detection assays powered by competitive allele-specific TaqMan PCR technology. *Biomed Res Int*. 2013;2013:385087. doi: 10.1155/2013/385087
9. Barbano R, Pasculli B, Coco M, et al. Competitive allele-specific TaqMan PCR (Cast-PCR) is a sensitive, specific and fast method for BRAF V600 mutation detection in Melanoma patients. *Sci Rep*. 2015;5:18592. doi: 10.1038/srep18592
10. Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*. 1990;348(6297):125-132. doi: 10.1038/348125a0
11. Landis CA, Masters SB, Spada A, et al. GTPase inhibiting mutations activate the alpha chain of Gs and stimulate adenylyl cyclase in human pituitary tumours. *Nature*. 1989;340(6236):692-696. doi: 10.1038/340692a0
12. Clementi E, Malgaretti N, Meldolesi J, Taramelli R. A new constitutively activating mutation of the Gs protein alpha subunit-gsp oncogene is found in human pituitary tumours. *Oncogene*. 1990;5(7):1059-1061.
13. Idowu BD, Al-Adnani M, O'Donnell P, et al. A sensitive mutation-specific screening technique for GNAS1 mutations in cases of fibrous dysplasia: the first report of a codon 227 mutation in bone. *Histopathology*. 2007;50(6):691-704. doi: 10.1111/j.1365-2559.2007.02676.x
14. O'Hayre M, Vazquez-Prado J, Kufareva I, et al. The emerging mutational landscape of G proteins and G-protein-coupled receptors in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(6):412-424. doi: 10.1038/nrc3521
15. Weinstein LS, Shenker A, Gejman PV, et al. Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune—Albright syndrome. *N Engl J Med*. 1991;325(24):1688-1695. doi: 10.1056/NEJM199112123252403
16. Candeliere GA, Roughley PJ, Glorieux FH. Polymerase chain reaction-based technique for the selective enrichment and analysis of mosaic arg201 mutations in Gαs from patients with fibrous dysplasia of bone. *Bone*. 1997;21(2):201-206. doi: 10.1016/s8756-3282(97)00107-5

17. Narumi S, Matsuo K, Ishii T, et al. Quantitative and sensitive detection of GNAS mutations causing mccune-albright syndrome with next generation sequencing. *PLoS One*. 2013;8(3):e60525. doi: 10.1371/journal.pone.0060525

18. de Sanctis L, Galliano I, Montanari P, et al. Combining real-time COLD- and MAMA-PCR TaqMan techniques to detect and quantify R201 GNAS mutations in the McCune—Albright syndrome. *Horm Res Paediatr*. 2017;87(5):342-349. doi: 10.1159/000463384

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:
Маказан Надежда Викторовна [Nadezhda V. Makazan, MD, PhD-student]; адрес: Россия, 117036, Москва, ул. Дм. Ульянова, д. 11 [address: 11 Dmitrya Ulyanova street, 117036 Moscow, Russia]; ORCID: http://orcid.org/0000-0003-3832-6367; eLibrary SPIN: 7156-6517; e-mail: nmakazan@yandex.ru
Орлова Елизавета Михайловна, к.м.н. [Elizaveta M. Orlova, MD, PhD]; ORCID: http://orcid.org/0000-0001-6196-5322; eLibrary SPIN: 5221-4235; e-mail: elizaveta.orlova@mail.ru
Колодкина Анна Александровна, к.м.н. [Anna A. Kolodkina, MD, PhD]; ORCID: http://orcid.org/0000-0001-7736-5372; eLibrary SPIN: 6705-6630; e-mail: anna_kolodkina@mail.ru
Карева Мария Андреевна, к.м.н. [Maria A. Kareva, MD, PhD]; ORCID: http://orcid.org/0000-0003-1320-6561; eLibrary SPIN: 5089-0310; e-mail: i_marusya@mail.ru
Калинченко Наталья Юрьевна, к.м.н. [Natalia Yu. Kalinchenko, MD, PhD]; ORCID: http://orcid.org/0000-0002-2000-7694; eLibrary SPIN: 6727-9653; e-mail: kalinnat@rambler.ru
Васильев Евгений Витальевич, к.б.н. [Evgeniy V. Vasiliev, PhD]; ORCID: http://orcid.org/0000-0003-1107-362X; eLibrary SPIN: 5767-1569; e-mail: vas-evg@ya.ru
Тюльпаков Анатолий Николаевич, д.м.н., проф. [Anatoliy N. Tiulpakov, MD, PhD, Professor]; ORCID: http://orcid.org/0000-0001-8500-4841; eLibrary SPIN 8396-1798; e-mail: anatolytiulpakov@gmail.com
Петеркова Валентина Александровна, акад. РАН, д.м.н., проф. [Valentina A. Peterkova, MD, PhD, Professor]; ORCID: http://orcid.org/0000-0002-5507-4627; eLibrary SPIN: 4009-2463; e-mail: peterkovava@hotmail.com

ИНФОРМАЦИЯ
Рукопись получена: 11.10.2017. Одобрена к публикации: 17.10.2017.

КАК ЦИТИРОВАТЬ:
Маказан Н.В., Орлова Е.М., Колодкина А.А., Карева М.А., Калинченко Н.Ю., Васильев Е.В., Тюльпаков А.Н., Петеркова В.А. Роль молекулярно-генетических методов исследования в диагностике синдрома Маккьюна—Олбрайта—Брайцева // *Проблемы эндокринологии*. — 2017. — Т. 63. — №6. — С. 360—368.
doi: 10.14341/probl2017636360-368

TO CITE THIS ARTICLE:
Makazan NV, Orlova EM, Kolodkina AA, Kareva MA, Kalinchenko NYu, Vasiliev EV, Tiulpakov AN, Peterkova VA. Use of molecular methods for diagnosis of McCune—Albright syndrome. *Problems of Endocrinology*. 2017;63(6):360-368.
doi: 10.14341/probl2017636360-368