

Оригинальное исследование | Original study

Молекулярно-генетические основы дисгенезии щитовидной железы

© Н.А. Макрецкая¹*, О.Б. Безлепкина¹, А.А. Колодкина¹, А.В. Кияев², Е.В. Васильев¹, В.М. Петров¹, О.А. Чиклаева¹, О.А. Малиевский³, И.И. Дедов¹, А.Н. Тюльпак¹¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России, Москва, Россия² ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Екатеринбург, Россия³ ГБУЗ РБ «Республиканская детская клиническая больница», Уфа, Россия

Врожденный гипотиреоз — гетерогенная группа заболеваний, объединенных общим признаком — снижением функции щитовидной железы (ЩЖ) к моменту рождения. 80–85% случаев заболевания обусловлены различными вариантами нарушения органогенеза ЩЖ. На сегодняшний день в литературе описано 5 генов: *TSHR*, *PAX8*, *FOXE1*, *NKX2-1*, *NKX2-5*, задействованных в патогенезе дисгенезии щитовидной железы.

Цель. Оценить частоту мутаций в генах *TSHR*, *PAX8*, *FOXE1*, *NKX2-1*, *NKX2-5* среди пациентов с тяжелым врожденным гипотиреозом.

Методы. В исследование включен 161 пациент с врожденным гипотиреозом (64 мальчика, 97 девочек) с уровнем тиреотропного гормона по данным скрининга или ретестирования более 90 мМЕ/л. При ультразвуковом исследовании ЩЖ у 138 обследуемых диагностированы различные варианты дисгенезии, у 23 пациентов объем железы соответствовал нормальным значениям относительно площади поверхности тела. Для молекулярно-генетического анализа применялся метод высокопроизводительного параллельного секвенирования. Секвенирование осуществлялось на полупроводниковом секвенаторе PGM (Ion Torrent, Life Technologies, США) с использованием панели праймеров «Гипотиреоз» (Custom DNA Panel). Оценка патогенности мутаций осуществлялась согласно последним международным рекомендациям (ACMG, 2015).

Результаты. Мутации в генах, приводящие к дисгенезии щитовидной железы, были выявлены у 13 пациентов (8,1%, 13/161): *TSHR*, $n = 6$; *NKX2-1*, $n = 3$; *NKX2-5*, $n = 1$; *PAX8*, $n = 3$; *FOXE1*, $n = 0$.

Заключение. Мутации в генах, обуславливающие развитие дисгенезии щитовидной железы, являются редкой патологией. Среди наших пациентов наибольшее количество мутаций выявлено в гене *TSHR*.

Ключевые слова: дисгенезия, высокопроизводительное параллельное секвенирование, врожденный гипотиреоз.

Study of molecular basis of thyroid dysgenesis

© Nina A. Makretskaya¹*, Olga B. Bezlepina¹, Anna A. Kolodkina¹, Alexey V. Kiyaev², Evgeny V. Vasilyev¹, Vasily M. Petrov¹, Olga A. Chikulaeva¹, Oleg A. Malievsky³, Ivan I. Dedov¹, Anatoliy N. Tiulpakov¹¹ Endocrinology Research Centre, Moscow, Russia² Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russia³ Republican Children's Clinical Hospital, Ufa, Russia

Congenital hypothyroidism is a heterogeneous group of diseases, which is manifested by loss of function of the thyroid gland that affects infants from birth. 80–85% of cases are due to different types of thyroid dysgenesis. 5 genes have been described that are involved in the pathogenesis of thyroid dysgenesis: *TSHR*, *PAX8*, *FOXE1*, *NKX2-1*, *NKX2-5*.

Aims. To evaluate the prevalence of mutations in the genes *TSHR*, *PAX8*, *FOXE1*, *NKX2-1*, *NKX2-5* among patients with severe congenital hypothyroidism.

Materials and methods. 161 patients (64 boys, 97 girls) with congenital hypothyroidism (TSH levels at neonatal screening or retesting greater than 90 mU/l) were included in the study. 138 subjects had different variants of thyroid dysgenesis, and 23 patients had normal volume of the gland. A next generation sequencing was used for molecular-genetic analysis. Sequencing was performed using PGM semiconductor sequencer (Ion Torrent, Life Technologies, USA) and a panel “Hypothyroidism” (Custom DNA Panel). Assessment of the pathogenicity of sequence variants were carried out according to the latest international guidelines (ACMG, 2015).

Results. 13 patients had variants in thyroid dysgenesis genes (8,1%, 13/161): *TSHR*, $n = 6$; *NKX2-1*, $n = 3$; *NKX2-5*, $n = 1$; *PAX8*, $n = 3$; *FOXE1*, $n = 0$.

Conclusions. Mutations in thyroid dysgenesis genes are a rare pathology. The majority of variants among our patients were identified in *TSHR*.

Key words: thyroid dysgenesis, next generation sequencing, congenital hypothyroidism.

Дисгенезия щитовидной железы (ЩЖ) объединяет гетерогенную группу пороков развития органа и согласно исследованиям, основанным на методах визуализации, составляет 80–85% всех случаев врожденного гипотиреоза (ВГ) [1, 2]. В структуре данной патологии выделяют аплазию ЩЖ (20–30%) вследствие нарушения процессов детерминации или ускорения апоптоза предшественников фолликулярных клеток ЩЖ, эктопию (50–60%), обусловленную преждевременным прекращением миграционного процесса, а также гипоплазию органа (5%) [2–4].

К настоящему моменту идентифицировано 5 генов, ответственных за развитие ВГ вследствие дисгенезии ЩЖ: *TSHR*, *PAX8*, *FOXE1*, *NKX2-1*, *NKX2-5* [5]. Изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе патогенеза дисгенезии органа, позволило выделить изолированные формы заболевания и ВГ в составе наследственных синдромов [5]. Так, мутации в генах *PAX8* и *TSHR* приводят к изолированным нарушениям процессов эмбриогенеза ЩЖ [5], мутации в *NKX2-1* и *FOXE1* — к синдромам “мозг — легкие — щитовидная железа” и Бамфорта—Лазаруса соответственно [5]. Обособленное положение занимает ген *NKX2-5*, экспрессия которого выявлена помимо щитовидной железы также и в сердце [6, 7]. Исходя из профиля экспрессии, мутации в *NKX2-5* должны приводить к синдромальной форме заболевания, однако на сегодняшний день нет достоверных данных ни о роли данного гена в самих процессах эмбриогенеза ЩЖ, ни о случаях мутаций с доказанной патогенностью, приводящих к развитию дисгенезии ЩЖ [6, 7].

В настоящей работе впервые в Российской Федерации изучена частота мутаций в генах, ответственных за развитие дисгенезии щитовидной железы, на выборке из 161 пациента.

Цель

Изучить частоту моногенных форм тяжелого врожденного гипотиреоза вследствие мутаций в генах *TSHR*, *PAX8*, *FOXE1*, *NKX2-1*, *NKX2-5*.

Методы

Дизайн исследования

Проведено обсервационное многоцентровое одномоментное выборочное неконтролируемое исследование с участием пациентов с тяжелым врожденным гипотиреозом.

Критерии соответствия

Критерием включения в исследование было повышение уровня тиреотропного гормона (ТТГ) по данным неонатального скрининга или ретестирования более 90 мМЕ/л. Неонатальный скрининг был

проведен всем пациентам по месту жительства в соответствии с приказом Минздравсоцразвития РФ от 22.03.2006 №185 “О массовом обследовании новорожденных детей на наследственные заболевания”.

Критерием исключения из исследования было увеличение размеров щитовидной железы (ВОЗ, 2003) по данным неонатального скрининга.

Условия проведения

Первичное обследование и набор пациентов были проведены на следующих базах: ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии” Минздрава России (Москва), ГБУЗ РБ “Республиканская детская клиническая больница” (Уфа), ГБУЗ СО “Областная детская клиническая больница №1” (Екатеринбург).

Продолжительность исследования

Набор пациентов проводился в период с ноября 2014 г. по сентябрь 2016 г.

Исходы исследования

В ходе проведения молекулярно-генетического исследования оценивались наличие и частота обнаружения мутаций в генах *TSHR*, *NKX2-1*, *NKX2-5*, *PAX8*, *FOXE1*.

Методы регистрации исходов

Молекулярно-генетический анализ проводился в лаборатории отделения наследственных эндокринопатий ФГБУ “НМИЦ эндокринологии” Минздрава России. Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови стандартным методом (набор Pure Link, Genomic DNA Mini Kit, Life Technologies, США). Для молекулярно-генетического анализа применялся метод NGS. Использовалась разработанная в отделении наследственных эндокринопатий ФГБУ “НМИЦ эндокринологии” Минздрава России панель праймеров для мультиплексной ПЦР и секвенирования с применением технологии Ion Ampliseq™ Custom DNA Panel (Life Technologies, США). Панель праймеров “Гипотиреоз” охватывает кодирующие области следующих генов: *TPO*, *PAX8*, *NKX2-5*, *IYD*, *SLC26A4*, *TG*, *GLIS3*, *FOXE1*, *NKX2-1*, *DUOX2*, *DUOX1*, *DOXA2*, *TSHR*, *SLC5A5*, *TSHB*, *THRB*, *THR*, *UBR1*, *THRA*, *SLC16A2*. Подготовка библиотек и эмульсионная ПЦР проводились в соответствии с рекомендациями производителя. Секвенирование осуществлялось на полупроводниковом секвенаторе PGM (Ion Torrent, Life Technologies, США). Биоинформатическая обработка результатов секвенирования проводилась с помощью программного модуля Torrent Suite 4.2.1 (Ion Torrent, Life Technologies, США) и пакета про-

грамм Anovav (версия 2014Nov12) [8]. После анализа полученных данных проводилось подтверждение полученных мутаций на секвенаторе Genetic Analyzer Model 3130 (Life Technologies, США). В качестве референсных последовательностей генов использовались ссылки Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). Интерпретация результатов исследований и оценка патогенности нуклеотидных изменений проводились согласно международным рекомендациям [9]. Обозначение мутаций проведено в соответствии с рекомендациями den Dunnen и Antonarakis [10].

Одному пациенту с подозрением на обширную делецию в гене *PAX8* по результатам анализа покрытия NGS и пациентам с одной гетерозиготной мутацией в гене *TSHR* ($n = 3$) проведена мультиплексная амплификация лигазо-связанных проб (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA). При этом использовался набор зондов SALSA MLPA probemix P319, включающих последовательность генов *TPO*, *PAX8*, *FOXE1*, *NKX2-1*, *TSHR* (MRC-Holland, Нидерланды), и стандартный набор реагентов SALSA MLPA EK1-FAM (MRC-Holland, Нидерланды). Обработка полученных данных проведена с использованием программного обеспечения Coffalyser.Net (MRC-Holland, Нидерланды).

Этическая экспертиза

Данное исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России (протокол №12 от 22.10.2014). Информированное согласие было получено от всех обследованных пациентов; если возраст обследованных не достиг 15 лет, информированное согласие было подписано законным представителем в соответствии с протоколом исследования.

Статистический анализ

Размер выборки участников предварительно не рассчитывался. Статистическая обработка данных проводилась на персональном компьютере с использованием пакета прикладных программ Excel Microsoft Office 2013 и STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc., USA, Version 10.0). Для количественных признаков рассчитывались медианы (Me), перцентили [25; 75].

Результаты

Объекты (участники) исследования

В исследование был включен 161 пациент с диагнозом «врожденный гипотиреоз» (ТТГ более 90 мМЕ/л).

Медиана возраста пациентов на момент проведения исследования составила 5,1 года [2,9; 10,8], самому младшему пациенту было 2 нед, старшему —

17 лет 11 мес. Распределение по полу было следующим: 97 девочек (60,25%) и 64 мальчика (39,75%).

В ходе проведения ультразвукового исследования щитовидной железы получены следующие результаты: щитовидная железа нормального объема выявлена у 23 пациентов, гипоплазия — у 97, эктопия органа — у 10 и полная аплазия — у 31 обследуемого.

Основные результаты исследования

По результатам проведенного молекулярно-генетического исследования мутации в гене *TSHR* были выявлены у 6 пациентов (3,73%, 6/161), *NKX2-1* — у 3 обследуемых (1,86%, 3/161), *NKX2-5* — у 1 (0,62%, 1/161), *PAX8* — у 3 (1,86%, 3/161) (таблица). Мутации в гене *FOXE1* обнаружены не были.

В нашем исследовании компаунд-гетерозиготная мутация в гене *TSHR* выявлена у одного пациента (N4), у двух сибсов от близкородственного брака (N1-1 и N1-2) выявлена гомозиготная мутация, трое пациентов (N2, N3-1, N3-2) имели по одной гетерозиготной мутации (таблица). Пациентам из последней группы (N2, N3-1, N3-2) проведено дополнительное генетическое исследование методом мультиплексной амплификации лигазо-связанных проб, однако патологических изменений выявлено не было.

Среди идентифицированных нами нуклеотидных изменений ранее описанной оказалась только миссенс-мутация с.C484G p.P162A (замена пролина на аланин в положении 162) [11]. По результатам функционального исследования выявлено, что для стимуляции мутантного рецептора требуется значительное повышение уровня ТТГ (в 20 раз) по сравнению с нормой [11].

Клинически у пациентов с мутациями в *TSHR* выявлены уменьшенные или нормальные размеры ЩЖ, что согласуется с патогенезом заболевания (таблица). У двух сибсов с гомозиготной мутацией p.I47fs обнаружена аплазия ЩЖ, что вероятно связано с полной утратой рецептором функциональной активности.

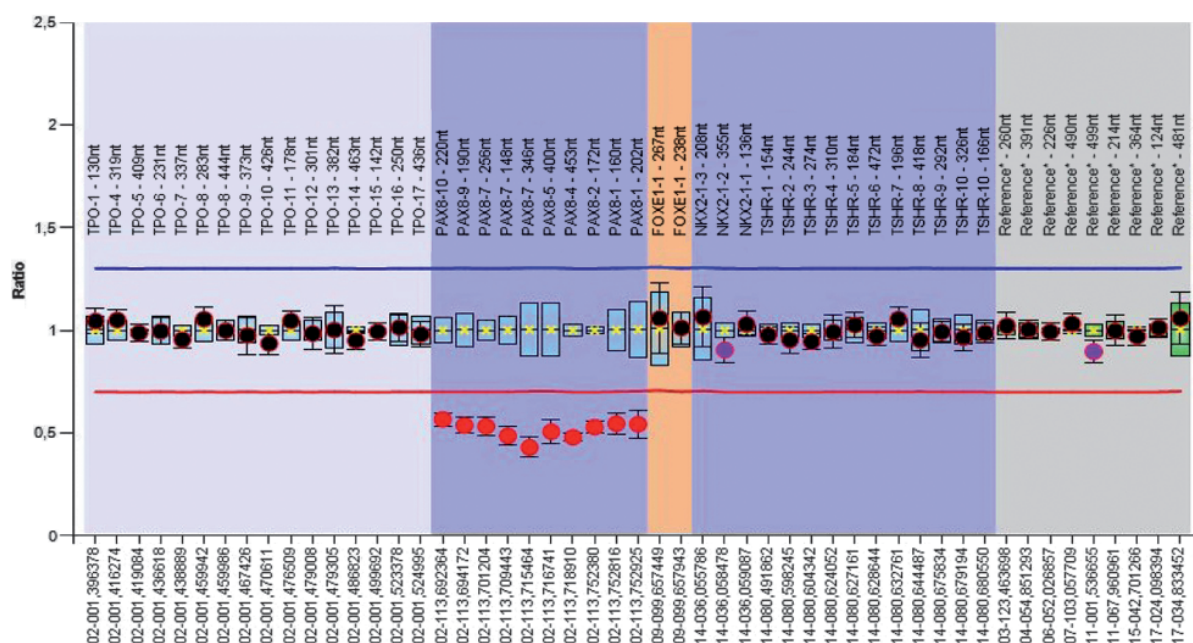
Различные нуклеотидные изменения в гене *NKX2-1* выявлены у 3 пациентов: 2 делеции со сдвигом рамки считывания, которые были классифицированы как патогенные, и 1 миссенс-мутация с неопределенной патогенностью (таблица, подробное описание клинического случая N5 было представлено нами ранее [12]). Все нуклеотидные изменения выявлены в гетерозиготном состоянии, что согласуется с аутосомно-доминантным типом наследования, характерным для данного заболевания [13]. У пациентов N5 и N7 помимо ВГ были диагностированы дополнительные компоненты синдрома. С первых месяцев жизни у пациента N5 выявлена мышечная гипотония, задержка моторного развития,

Спектр нуклеотидных изменений, выявленных в генах, ответственных за развитие дисгенезии ЩЖ, и клиническая характеристика пациентов

Пациент	Ген	Нуклеотидная замена	Аминокислотная замена	Патогенность	Зиготность	ExAC*	HGMD#	Щитовидная железа	Ассоциированные пороки
N1-1	<i>TSHR</i>	c.141delC	p.I47fs	Патогенная Патогенная Возможно патогенная Неопределенная патогенность	Hom	NA	NA	Аплазия	Нет
N1-2	<i>TSHR</i>	c.141delC	p.I47fs		Hom	NA	NA	Аплазия	Нет
N2	<i>TSHR</i>	c.C484G	p.P162A		Het	0.00017	Описана [11]	Гипоплазия	Нет
N3-1	<i>TSHR</i>	c.G902A	p.C301Y		Het	NA	NA	Нормальный объем	Нет
N3-2	<i>TSHR</i>	c.G902A	p.C301Y	Неопределенная патогенность	Het	NA	NA	Нормальный объем	Нет
N4	<i>TSHR</i>	c.C1532T	p.T511M	Неопределенная патогенность	ComHet	0.000033	NA	Нормальный объем	Нет
	<i>TSHR</i>	c.T1697G	p.V566G	Неопределенная патогенность		NA	NA		
N5	<i>NKX2-1</i>	c.628_772del		Патогенная Неопределенная патогенность	Het	NA	NA	Гипоплазия	Хорея
N6	<i>NKX2-1</i>	c.A1180G	p.T394A		Het	NA	NA	Аплазия	Нет
N7	<i>NKX2-1</i>	c.943_949del TGCAGCCT		Патогенная	Het	NA	NA	Нормальный объем	Респираторный дистресс-синдром, мышечная гипотония
N8	<i>NKX2-5</i>	c.G676A	p.D226N	Неопределенная патогенность	Het	NA	NA	Гипоплазия	Нет
N9	<i>PAX8</i>	c.A701G	p.E234G	Неопределенная патогенность	Het	NA	NA	Гипоплазия	Нет
N10	<i>PAX8</i>	c.G440A	p.C147Y	Неопределенная патогенность	Het	NA	NA	Гипоплазия	Нет
N11	<i>PAX8</i>	chr2:113973574_114036498del		Патогенная	Het	NA	NA	Гипоплазия	Нет

* The Human Gene Mutation Database (HGMD®) (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>) [23]; *ExAC database (<http://exac.broadinstitute.org>) [24]; NA – нет данных; Het – гетерозиготная мутация; ComHet – компаунд-гетерозиготная мутация; Hom – гомозиготная мутация; NCBI Референсные последовательности (www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore): *TSHR*, NM_000369; *NKX2-1*, NM_001079668; *NKX2-5*, NM_004387; *PAX8*, NM_003466.

PAX8-10	02q13	02-113,692364	5183	24851	0,57	0,02	<<*	<<*	37	0,0
PAX8-9	02q13	02-113,694172	6285	33011	0,54	0,02	<<*	<<*	32	0,0
PAX8-7	02q13	02-113,701204	5922	31673	0,53	0,02	<<*	<<*	53	0,0
PAX8-7	02q13	02-113,709443	3945	19714	0,49	0,02	<<*	<*	34	0,0
PAX8-7	02q13	02-113,715464	1262	8341	0,43	0,02	<<*	<<*	56	-0,1
PAX8-5	02q13	02-113,716741	2710	17406	0,51	0,03	<<*	<<*	51	-0,1
PAX8-4	02q13	02-113,718910	2064	14329	0,48	0,01	<<*	<<*	58	-0,2
PAX8-2	02q13	02-113,752380	6213	28655	0,53	0,02	<<*	<<*	38	-0,1
PAX8-1	02q13	02-113,752816	5334	25145	0,55	0,02	<<*	<<*	45	0,0
PAX8-1	02q13	02-113,752925	4168	19367	0,54	0,03	<<*	<<*	36	0,0



Результаты MLPA у пациента N11.

в возрасте 15 мес появились гиперкинезы ног. У пациента N7 выявлен наиболее тяжелый вариант заболевания. При рождении отмечалась нарастающая дыхательная недостаточность, потребовавшая перевода ребенка на искусственную вентиляцию легких (снят в возрасте 1 мес), диагностирована внутриутробная правосторонняя очагово-сливная пневмония. При осмотре в возрасте 7 мес обращает на себя внимание общая мышечная гипотония, гиперкинезы не выявлены.

У трех пациентов были идентифицированы мутации в гене *PAX8* (таблица): 2 миссенс-мутации с неопределенной патогенностью и 1 обширная делеция. Среди данных пациентов особый интерес представляет обследуемый N11. В ходе анализа результатов высокопроизводительного параллельного секвенирования была заподозрена обширная делеция гена, что и было доказано методом MLPA (рисунок). По данным ультразвукового исследования у всех пациентов из данной группы выявлена гипоплазия

ЩЖ, которая является характерным проявлением дефектов в гене *PAX8* [14].

В данном исследовании выявлена 1 гетерозиготная миссенс-мутация в гене *NKX2-5* (таблица), отнесенная к вариантам с неопределенной патогенностью, пороков развития сердца у данного пациента не обнаружено.

Обсуждение

Резюме основного результата исследования

В нашем исследовании был проведен анализ генов-кандидатов, мутации в которых приводят к развитию различных нарушений органогенеза ЩЖ (*TSHR*, *PAX8*, *FOXE1*, *NKX2-1*, *NKX2-5*), на выборке из 161 пациента из Российской Федерации. Полученные нами результаты подтвердили, что мутации в генах дисгенеза являются крайне редкой патологией, что согласуется с данными мировой литературы [15, 16].

Обсуждение основного результата исследования

Первые масштабные исследования по изучению этиологии врожденного гипотиреоза и распространенности различных форм заболевания были основаны на методах визуализации [1, 2, 17]. При этом ВГ, обусловленный дисгенезией органа, выявлен у 80–85% пациентов, остальные 15–20% случаев были обусловлены дисгормоногенезом и сопряжены с увеличением размеров ЩЖ [1, 2, 17]. Полученные данные позволили предположить, что основной причиной развития ВГ являются мутации в генах-кандидатах, ответственных за эмбриогенез щитовидной железы. Последующие исследования были направлены на подтверждение данной гипотезы [15, 16]. Однако молекулярная основа была установлена менее чем у 6% обследуемых [15, 16].

Инактивирующие мутации *TSHR* приводят к широкому фенотипическому спектру, от тяжелого врожденного гипотиреоза до изолированного повышения уровня ТТГ. Чувствительность тканей щитовидной железы к стимулирующему действию ТТГ может полностью отсутствовать, что приводит к нарушению роста органа [11, 18]. Степень резистентности к ТТГ зависит от типа мутации и количества мутировавших аллелей [18]. Тяжелый врожденный гипотиреоз с гипоплазией ЩЖ, как правило, встречается при биаллельных мутациях, в то время как моноаллельные изменения приводят к мягким формам заболевания [18]. Однако фенотипическая вариабельность является характерной чертой мутаций гена *TSHR*, в том числе описаны случаи гипоплазии железы при гетерозиготных изменениях [18]. К настоящему моменту в гене *TSHR* выявлено более 60 инактивирующих мутаций, приводящих к развитию синдрома резистентности к ТТГ [18]. Мутации распределены по всей длине гена, за исключением интрацеллюлярной С-концевой области [18]. В нашем исследовании различные нуклеотидные изменения в гене *TSHR* выявлены у 6 обследуемых, в том числе у 2 пар сибсов. Интересно, что у пациентов N2, N3-1, N3-2 было обнаружено только по 1 гетерозиготной миссенс-мутации, несмотря на наличие у них тяжелого ВГ. Мутация p.C301Y представляет собой замену цистеина на тирозин в области цистеин-богатых доменов, что должно приводить к нарушению связывания с лигандом и, возможно, к дезорганизации третичной структуры белка. Миссенс-мутация c.C484G p.P162A (пациент N2) была ранее исследована, ее патологическая значимость доказана *in vitro* [11].

В гене *NKX2-1* описано более 70 мутаций [5], которые приводят к развитию синдрома “мозг — легкие — щитовидная железа”, классическими проявле-

ниями которого являются доброкачественная наследственная хорей, гипотиреоз и респираторный дистресс-синдром [13]. Однако совокупность всех трех симптомов данного заболевания встречается только в 50% случаев и чаще всего обусловлена наличием таких мутаций, как инсерции и делеции со сдвигом рамки считывания [13]. В нашей когорте наиболее тяжелое течение заболевания также отмечалось именно у пациентов с обширными делециями гена *NKX2-1*.

Кодируемый геном *PAX8* белок является транскрипционным фактором, принадлежащим к семейству PAX, отличительной чертой которого является наличие консервативного ДНК-связывающего домена (paired box domain) [19]. Существует описание более 20 инактивирующих мутаций в данном гене, большинство из которых локализовано в ДНК-связывающем домене [19]. В проведенном нами исследовании выявлена мутация c.G440A p.C147Y, локализованная в экзоне 5, кодирующем фрагмент белка между ДНК-связывающим доменом и консервативным октапептидом [20]. Ранее мутации в этой части *PAX8* идентифицированы не были, в связи с чем влияние данного изменения на функцию белка не определено [20]. Миссенс-мутация c.A701G p.E234G расположена в центральном гомеодомене, должна приводить к снижению транскрипционной активности [20].

Относительно роли белка NKX2-5 в процессах развития и функционирования щитовидной железы к настоящему моменту остается большое количество вопросов. Известно лишь о наличии экспрессии *NKX2-5* в зачатке щитовидной железы во время эмбриогенеза [6], в связи с чем мутации в этом гене и были предложены как новый механизм формирования дисгенезии щитовидной железы [7]. После выдвижения данной теории М. Dentice и соавт. провели скрининг группы пациентов с различными вариантами дисгенезии ЩЖ и врожденным гипотиреозом на наличие мутаций в гене *NKX2-5*, в результате чего у четырех обследуемых были идентифицированы 3 различные миссенс-мутации в гетерозиготном состоянии [7]. При ультразвуковом исследовании у троих пациентов выявлена эктопия, у одного — аплазия ЩЖ, незначительные нарушения со стороны сердечно-сосудистой системы обнаружены только у одного пациента [7]. Функциональные исследования в ходе данной работы были проведены для всех мутаций, при этом отмечалось снижение активации промоторов генов *TG*, *TPO* и *DUOX2* [7]. Несмотря на полученные результаты, патогенность изменений вызывает сомнения по ряду причин. Во-первых, аналогичные мутации были выявлены у здоровых родителей, во-вторых, одна из мутаций идентифицирована у одного обследуемого из группы контроля [7].

Авторы исследования объясняют это различной степенью пенетрантности и вариабельной экспрессией гена на уровне тканей ЩЖ и сердца [7]. Между тем на сегодняшний день в мировой литературе не представлено весомых доказательств выдвинутых гипотез.

Мутации гена *FOXE1* сопровождаются формированием классического симптомокомплекса: врожденный гипотиреоз, аплазия ЩЖ, расщелина неба, двусторонняя атрезия хоан, раздвоенный надгортанник и “стоящие торчком” волосы, получившего название синдром Бамфорта—Лазаруса [21, 22]. К настоящему моменту в гене *FOXE1* зарегистрировано всего 6 миссенс-мутаций, все расположены в ДНК-связывающем домене [5, 22]. У пациентов из нашей когорты мутации в гене *FOXE1* обнаружены не были, что было ожидаемо, так как ни у одного пациента не выявлено классических проявлений синдрома.

Ограничения исследования

Идентификация у наших пациентов ранее не описанных нуклеотидных изменений требует проведения функциональных исследований *in vivo* или *in vitro* с целью уточнения влияния данных мутаций на функциональную активность белка. Несмотря на то что эти исследования в нашей работе проведены не были, обнаруженные мутации имеют высокую вероятность патогенности по результатам прогнозирования *in silico*.

Заключение

Проведенное нами исследование подтвердило низкую частоту встречаемости мутаций в генах *TSHR*, *PAX8*, *FOXE1*, *NKX2-1*, *NKX2-5*. Тем не менее всем детям с диагнозом “врожденный гипотиреоз” рекомендуется проведение молекулярно-генетического исследования, что в ряде случаев позволит определить оптимальную тактику наблюдения и ведения пациентов, а в дальнейшем провести генетическое консультирование по вопросам дальнейшего планирования семьи.

Дополнительная информация

Источник финансирования. Работа выполнена при содействии Фонда поддержки и развития филантропии “КАФ”.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Список литературы [References]

- Devos H, Rodd C, Gagne N, et al. A search for the possible molecular mechanisms of thyroid dysgenesis: sex ratios and associated malformations. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(7):2502-2506. doi: 10.1210/jcem.84.7.5831.
- Bubuteishvili L, Garel C, Czernichow P, Léger J. Thyroid abnormalities by ultrasonography in neonates with congenital hypothyroidism. *J Pediatr*. 2003;143(6):759-764. doi: 10.1067/s0022-3476(03)00537-7.
- Van Vliet G, Deladoey J. *Hypothyroidism in infants and children: congenital hypothyroidism*. In: Braverman LE, Cooper D, editors. *Werner & Ingbar's the thyroid: a fundamental and clinical text*. 10th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2012. p. 790–802.
- Rastogi MV, LaFranchi SH. Congenital hypothyroidism. *Orphanet J Rare Dis*. 2010;5(1):17. doi: 10.1186/1750-1172-5-17.
- Szinnai G. Clinical genetics of congenital hypothyroidism. *Endocr Dev*. 2014;26:60-78. doi: 10.1159/000363156.
- Lints TJ, Parsons LM, Hartley L, et al. Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development*. 1993;119(2):419-431.
- Dentice M, Cordeddu V, Rosica A, et al. Missense mutation in the transcription factor NKX2-5: a novel molecular event in the pathogenesis of thyroid dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(4):1428-1433. doi: 10.1210/jc.2005-1350.
- Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(16):e164. doi: 10.1093/nar/gkq603.
- Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-424. doi: 10.1038/gim.2015.30.
- den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, et al. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum Mutat*. 2016;37(6):564-569. doi: 10.1002/humu.22981.
- Sunthornthepvarakul T, Gottschalk ME, Hayashi Y, Refetoff S. Brief report: resistance to thyrotropin caused by mutations in the thyrotropin-receptor gene. *N Engl J Med*. 1995;332(3):155-160. doi: 10.1056/NEJM199501193320305.
- Макрецкая НА, Калинин НЮ, Васильев ЕВ, и др. Клинический случай врожденного гипотиреоза, обусловленного дефектом гена *NKX2-1*. // Проблемы эндокринологии. — 2016. — Т. 62. — №3. — С. 21–24. [Makretskaya NA, Kalinchenko NY, Vasiliev EV, et al. Case of congenital hypothyroidism related to *NKX2-1*. *Problems of Endocrinology*. 2016;62(3):21-24. (In Russ.)] doi: 10.14341/probl201662321-24.
- Gras D, Jonard L, Roze E, et al. Benign hereditary chorea: phenotype, prognosis, therapeutic outcome and long term follow-up in a large series with new mutations in the *TITF1/NKX2-1* gene. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012;83(10):956-962. doi: 10.1136/jnnp-2012-302505.
- Montanelli L, Tonacchera M. Genetics and phenomics of hypothyroidism and thyroid dys- and agenesis due to *PAX8* and *TTF1* mutations. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;322(1-2):64-71. doi: 10.1016/j.mce.2010.03.009.
- Narumi S, Muroya K, Abe Y, et al. *TSHR* mutations as a cause of congenital hypothyroidism in Japan: a population-based genetic epidemiology study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(4):1317-1323. doi: 10.1210/jc.2008-1767.

16. Al Taji E, Biebermann H, Limanova Z, et al. Screening for mutations in transcription factors in a Czech cohort of 170 patients with congenital and early-onset hypothyroidism: identification of a novel PAX8 mutation in dominantly inherited early-onset non-autoimmune hypothyroidism. *Eur J Endocrinol.* 2007;156(5):521-529. doi: 10.1530/EJE-06-0709.
17. Bamforth JS, Hughes IA, Lazarus JH, et al. Congenital hypothyroidism, spiky hair, and cleft palate. *J Med Genet.* 1989;26(1):49-51. doi: 10.1136/jmg.26.1.49.
18. Cassio A, Nicoletti A, Rizzello A, et al. Current loss-of-function mutations in the thyrotropin receptor gene: when to investigate, clinical effects, and treatment. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2013;5 Suppl 1:29-39. doi: 10.4274/jcrpe.864.
19. Plachov D, Chowdhury K, Walther C, et al. PAX8, a murine paired box gene expressed in the developing excretory system and thyroid gland. *Development.* 1990;110(2):643-651.
20. de Sanctis L, Corrias A, Romagnolo D, et al. Familial PAX8 small deletion (c.989_992delACCC) associated with extreme phenotype variability. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(11):5669-5674. doi: 10.1210/jc.2004-0398.
21. Bamforth JS, Hughes IA, Lazarus JH, et al. Congenital hypothyroidism, spiky hair, and cleft palate. *J Med Genet.* 1989;26(1):49-51. doi: 10.1136/jmg.26.1.49.
22. Clifton-Bligh RJ, Wentworth JM, Heinz P, et al. Mutation of the gene encoding human TTF-2 associated with thyroid agenesis, cleft palate and choanal atresia. *Nat Genet.* 1998;19(4):399-401. doi: 10.1038/1294.
23. Stenson PD, Mort M, Ball EV, et al. The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Hum Genet.* 2017;136(6):665-677. doi: 10.1007/s00439-017-1779-6.
24. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature.* 2016;536(7616):285-291. doi: 10.1038/nature19057.

Информация об авторах [Authors info]

***Макрецкая Нина Алексеевна**, н.с. [Nina A. Makretskaya, MD, research associate], адрес: Россия, 117036,

Москва, ул. Дм. Ульянова, д. 11 [address: 11 Dm. Ulyanova street, 117036 Moscow, Russia];

ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0412-7140>; eLibrary SPIN: 4467-7880; e-mail: makretskayan@gmail.com.

Безлепкина Ольга Борисовна, д.м.н., профессор [Olga B. Bezlepina, MD, PhD, Professor]; eLibrary SPIN-код: 3884-0945;

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9621-5732>; e-mail: olgabezlepina@mail.ru.

Колодкина Анна Александровна, к.м.н., с.н.с. [Anna A. Kolodkina, MD, PhD, senior research associate];

eLibrary SPIN-код: 6705-6630; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7736-5372>; e-mail: anna_kolodkina@mail.ru.

Кияев Алексей Васильевич, д.м.н., доцент [Alexey V. Kiyaev, MD, PhD, assistant professor]; eLibrary SPIN-код: 7092-7894;

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5578-5242>; e-mail: thyroend@mail.ru.

Васильев Евгений Витальевич, к.б.н., с.н.с. [Evgeny V. Vasilyev, PhD, senior research associate]; eLibrary SPIN-код: 5767-1569;

ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1107-362X>; e-mail: vas-evg@yandex.ru.

Петров Василий Михайлович, к.х.н., с.н.с. [Vasily M. Petrov, PhD, senior research associate]; eLibrary SPIN-код: 4358-2147;

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-0520-9132>; petrov.vasily@gmail.com.

Чиклаева Ольга Александровна, к.м.н. [Olga A. Chikulaeva, MD, PhD]; eLibrary SPIN-код: 6813-5061;

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4743-4661>; e-mail: chikulaeva.olga@gmail.com.

Малиевский Олег Артурович, д.м.н., профессор [Oleg A. Malievsky, MD, PhD, Professor]; eLibrary SPIN-код: 6813-5061;

ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2599-0867>; e-mail: malievsky@list.ru

Дедов Иван Иванович, д.м.н., профессор, академик РАН [Ivan I. Dedov, MD, PhD, Professor]; eLibrary SPIN: 5873-2280;

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8175-7886>; e-mail: dedov@endocrincentr.ru.

Тюльпаков Анатолий Николаевич, д.м.н. [Anatoliy N. Tiulpakov, MD, PhD]; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8500-4841>;

eLibrary SPIN: 8396-1798; e-mail: ant@endocrincentr.ru.

Как цитировать [To cite this article]

Макрецкая Н.А., Безлепкина О.Б., Колодкина А.А., Кияев А.В., Васильев Е.В., Петров В.М., Чиклаева О.А., Малиевский О.А., Дедов И.И., Тюльпаков А.Н. Молекулярно-генетические основы дисгенезии щитовидной железы. // Клиническая и экспериментальная тиреоидология. — 2018. — Т.14. — №2. — С. 64-71.

doi: 10.14341/ket9556

Makretskaya NA, Bezlepina OB, Kolodkina AA, Kiyaev AV, Vasilyev EV, Petrov VM, Chikulaeva OA, Malievsky OA, Dedov II, Tiulpakov AN. Study of molecular basis of thyroid dysgenesis. *Clinical and experimental thyroidology.* 2018;14(2):64-71. doi: 10.14341/ket9556

Рукопись получена: 06.02.2018. Рукопись одобрена: 05.03.2018.

Received: 06.02.2018.

Accepted: 05.03.2018.