

Д.Р. Арупова, Е.У. Куандыков  
Казахский Национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ПРОГРЕССИРУЮЩИХ МЫШЕЧНЫХ ДИСТРОФИЙ

Наследственные болезни нервной системы (НБНС) составляют одну из наиболее многочисленных групп моногенных болезней человека. Тяжелое прогрессирующее течение многих НБНС, частая инвалидизация больных, отсутствие эффективных методов лечения, высокий риск появления повторных случаев заболевания делают наиболее актуальным проведение профилактических мероприятий вотягощенных семьях. Основу планирования характера и объема регионально ориентированных профилактических мероприятий должны составлять данные популяционно-эпидемиологических исследований, позволяющие получить представление о распространенности, спектре, генетическом разнообразии и особенностях фенотипических проявлений отдельных НБНС. Эти данные являются основой для создания специализированных профилактических регистров по НБНС, позволяющих осуществлять активную диспансеризацию отягощенных семей, а также планировать объем и характер медико-генетического консультирования в отдельных регионах. Материалом для исследования послужили образцы ДНК пациентов. Было обследовано 26 больных мужского пола от 5 до 16 лет. Впервые в популяции города Алматы и Алматинской области была проведена молекулярно-генетическая диагностика миодистрофии Дюшенна у детей. На сегодняшний день данный метод является единственным профилактическим мероприятием, что тем самым дает возможность для проведения пренатальной диагностики в семьях высокого риска.

Принимая во внимание тот факт, что для основной части заболеваний из данной группы характерно неуклонно прогрессирующее течение и отсутствие эффективных методов лечения, нервно-мышечные болезни следует признать одной из наиболее актуальных проблем клинической неврологии. Профилактика повторных случаев нервно-мышечных болезней в семьях «высокого риска» является на сегодняшний день единственным эффективным средством борьбы с этими тяжелыми и нередко фатальными недугами, при том центральное место в системе профилактических мероприятий занимает ДНК-диагностика.

**Ключевые слова:** прогрессирующие мышечные дистрофии, миодистрофия Дюшенна, молекулярно-генетическая диагностика, наследственные болезни нервной системы

**Введение.** Дегенеративные заболевания с преимущественным поражением периферических нервов и мышц составляют значительную долю наследственной патологии человека.

Термином «мышечные дистрофии» обозначают группу клинически полиморфных генетически детерминированных заболеваний, в основе которых лежат первичные прогрессирующие дегенеративные изменения в мышечных волокнах. Различные формы миодистрофий отличаются друг от друга своей генетической природой, типом наследования, сроком дебюта, топографическим своеобразием распределения мышечных атрофий.

**Актуальность.** Прогрессирующие мышечные дистрофии (ПМД) представляют собой клинически и генетически гетерогенную группу наследственных заболеваний, характеризующихся первичным поражением скелетной мускулатуры невоспалительного характера. Распространенность данных заболеваний весьма высока — около 200 случаев на 1 млн. населения (Етегу А., 1993). Общей характеристикой ПМД является развитие нарастающих мышечных атрофий и парезов вследствие прогрессирующей дегенерации миоцитов, обусловленной поражением структурных белков сарколеммы или ключевых ферментов скелетных мышц. По данным Всемирной организации здравоохранения 4—5% всего населения страдают тяжелыми наследственными заболеваниями и аномалиями развития, среди которых Наследственные дефекты с поражением нервной системы составляют третью часть и занимают одно из ведущих мест. На долю всех наследственных болезней приходится почти 30% случаев госпитализации в детские больницы, кроме того, они являются причиной почти половины случаев смерти в развитых странах. Наследственные болезни нервной системы характеризуются неуклонно прогрессирующим течением, вызывая тяжелую инвалидность уже с детского возраста, и поэтому проблема их изучения является не только одной из наиболее актуальных медицинских, но и социально значимых проблем современной медицины. Данные исследований наследственных заболеваний, а именно прогрессирующих мышечных дистрофий, полученных в одних регионах, малопримемлемы для других ввиду наличия существенных различий в структуре наследственных болезней в разных популяциях из-за неоднородности этнических, географических и социальных факторов. В связи с малой изученностью наследственных заболеваний нервной системы в Казахстане становится очевидным актуальность такого рода исследований, что позволит правильно организовать специализированную медицинскую помощь, провести их раннюю диагностику и профилактику.

### Материалы и методы

Материалом для исследования послужили образцы ДНК пациентов. Было обследовано 26 больных мужского пола от 5 до 16 лет. Выделение ДНК из периферической крови обследуемых проводилось солевым методом с последующей хлорформ-фенольной очисткой и тестированием на 3% агарозном геле с различными концентрациями фага А.

Для регистрации фрагментов 19 различных экзонов и промоторной области гена дистрофина использовали диагностический набор праймеров DMD-del производства ООО «Центр молекулярной генетики», г. Москва. Реакция проведена в 23 мкл общего объема смеси, содержащей ПЦР-буфер 5.8 мкл, dNTP 2,5 мкл, по 10,0 мкл специфического праймера и 0,3 мкл активной Taq-полимеразы, ПЦР проводили по схеме:

начальная денатурация (95°C, 2 мин.); 32 цикла амплификации со следующими параметрами: 1) денатурация — 94°C, 45 секунд; 2) отжиг — 60°C, 45 секунд;

3) синтез — 72°C, 45 секунд; после чего проводили инкубацию при 72°C в течение 7 минут.

Проводили мультиплексную (мультипраймерную) ПЦР, основанную на одновременной амплификации в одной реакции нескольких экзонов исследуемого гена. Набор предназначен для регистрации фрагментов 19 различных экзонов и промоторной области гена дистрофина. Наиболее частой причиной возникновения миодистрофии Дюшенна/Беккера являются протяженные делеции в гене дистрофина. Локализация гена на X-хромосоме позволяет регистрировать фрагменты 19 экзонов и промоторной области гена дистрофина в гемизиготном состоянии у лиц мужского пола, и таким образом, делеция, затрагивающая один или несколько фрагментов, будет проявляться отсутствием соответствующих полос на геле. Система мультиплексной амплификации (МПА) позволяет в одной пробирке проводить одновременную регистрацию 10 фрагментов, что значительно убыстряет анализ по сравнению с обычной ПЦР.

Фрагменты анализировали в 7% акриламидном геле (сток — раствор АА/БА 2911). Электрофоретическое разделение фрагментов проводят при напряженности поля 17В/см в течение 1,5 — 2 часов (к моменту окончания разделения фрагментов лидирующий краситель ксилол-цианол должен пройти расстояние в 2/3 длины геля). В таблице 1 представлены длины регистрируемых фрагментов.

### Результаты и обсуждение.

Прогрессирующие мышечные дистрофии Дюшенна и Беккера относятся к самым частым формам мышечных дистрофий (1 на 3500 и 1 на 20000 рожденных мальчиков) и наследуется по X-сцепленному рецессивному типу (Emery A., 1991). Миодистрофии Дюшенна и Беккера являются аллельными вариантами, наследуются по рецессивному сцепленному с X-хромосомой типу и

обусловлены либо полным отсутствием синтеза, либо синтезом дефектного высокомолекулярного цитоскелетного белка-дистрофина. Из-за отсутствия дистрофина миофибриллы утрачивают устойчивость к циклическим актам сокращения-расслабления и разрываются. Саркоплазматические мембраны становятся нестабильными, нарушается работа ионных каналов, в результате повышается концентрация свободного внутриклеточного ионизированного кальция, который оказывает некротизирующее влияние на мышечные волокна, вызывая их лизис. Миодистрофия Дюшенна начинается в возрасте 3 — 6 лет со слабости мышц тазового пояса

и проксимальных отделов ног, нередко сопровождающейся псевдогипертрофиями икроножных, ягодичных, дельтовидных и других мышц, а также кардиомиопатией. К характерному клиническому маркеру миодистрофий относится «утиная» походка, связанная со слабостью ягодичных мышц, которые фиксируют таз относительно бедренной кости. В результате во время ходьбы возникают наклон таза в сторону неопорной ноги (феномен Тренделенбурга) и компенсаторный наклон туловища в противоположную сторону (феномен Дюшенна). Кроме того, у больных можно наблюдать ходьбу на пальцах, частые падения, медленное двигательное развитие и специфические ограничения при поднимании рук вверх, подъеме по лестнице, вставании с пола.

В дальнейшем характерна быстрая генерализация парезов и атрофий, нарастающая обездвиженность, развитие контрактур и дыхательных нарушений; гибель больных наступает обычно на 2-3 десятилетия жизни (Темин П.А. и др., 1997; Emery A., 1993; Specht L., Kunkel L., 1993).

Форма Беккера традиционно рассматривается как «мягкий» клинический вариант ПМД Дюшенна с более поздним началом болезни (в 12-15 лет), относительно доброкачественным течением и сохранностью способности к самостоятельной ходьбе на протяжении 15 – 20 лет от момента появления первых симптомов (Темин П.А. и соавторы, 1997). Женщины, являющиеся гетерозиготными носительницами мутантного гена, как правило, остаются клинически здоровыми, однако иногда у них могут наблюдаться отдельные субклинические проявления носительства мутации – умеренно выраженная мышечная слабость, увеличение объема икроножных мышц, высокий уровень в крови мышечного фермента креатинфосфокиназы (Emery A., 1993; Specht L., Kunkel L., 1993).

ПМД Дюшенна и Беккера являются аллельными заболеваниями и обусловлены мутациями одного гена в хромосомном локусе Xp 21 (Goodfellow P. et al., 1985; Mopako A. et al., 1986; Koenig M. et al., 1987). Данный ген является самым большим из известных на сегодня генов человека и имеет весьма сложную молекулярную организацию: он содержит, как минимум, 5 промоторов, свыше 80 экзонов, состоит из 24 000 кб и кодирует белок с молекулярной массой 427 килодальтон, получивший название «дистрофин» (Koenig M. et al., 1987; Hoffman E. et al., 1992).

В норме в мышечном волокне дистрофин локализуется на цитоплазматической поверхности сарколеммы, являясь важной составной частью цитоскелета и обеспечивая связь между актиновыми филаментами (т.е. сократительным аппаратом мышечного волокна) и сарколеммой (Ahn A., Kunkel L., 1989). Известна также изоформа дистрофина, экспрессирующаяся в центральной нервной системе, с отсутствием данной изоформы белка в мозге может быть связана умственная отсталость, имеющая место у 1/3 больных ПМД Дюшенна. Прогресс в изучении данной группы заболеваний связан с раскрытием в последние годы структурных и молекулярных основ, регулирующих функционирование мышечного волокна (Иллариошкин С.Н., Иванова – Смоленская И.А., 1998; Campbeel K., 1995; Worton R., Emery A., 1998).

Молекулярно-генетическая диагностика миодистрофии Дюшенна была проведена у 26 человек больных мужского пола от 5 до 16 лет. Из них у 10 (38,5%) человек были выявлены делеции в гене дистрофина. У 20,0% больных выявлены делеции в гене дистрофина с 44 по 51 экзон, у 20,0% - делеции в гене дистрофина с 47 по 50 экзон. У остальных пациентов (6 человек) выявлены делеции в различных экзонах.

Наиболее тяжелые клинические случаи наблюдаются у двух пациентов с миодистрофией Дюшенна.

Приводим наблюдения. Пациент М.А., 9 лет.

Молекулярно-генетическое исследование ДНК пациента показало наличие делеции в праймере МПА1 большой протяженностью с 32 - 47 экзон и 50 экзона, что сказалось на клиническом проявлении болезни (рисунок 1).

У данного ребенка наблюдается семейный характер течения болезни. В семье старший сын умер в возрасте 17 лет от прогрессирующей мышечной дистрофии Дюшенна. Заболевание стало проявляться в возрасте 6 лет, быстро прогрессировало, и на момент взятия крови на молекулярное исследование ребенок полностью утратил двигательную активность. Клинически наблюдались: слабость мышц тазового пояса и проксимальных отделов ног, псевдогипертрофия икроножных мышц, дельтовидных. Снижение сухожильных рефлексов, мышечного тонуса, мышечная сила в руках 2 балла. Имеются контрактуры в коленных, голеностопных суставах. Необходимо отметить, что чем раньше дебютирует заболевание, тем злокачественнее оно протекает.

Пациент - Д. В., 6 лет.

У данного пациента были выявлены делеции в двух праймерах в МПА1 52, 53 экзонов и в МПА2 делеция 50 экзона, что сказалось на клинических проявлениях данного заболевания (рисунок 2).

Заболевание протекает злокачественно, очень быстро прогрессирует. На момент осмотра ребенок уже практически утратил двигательную активность, наблюдалась слабость мышц проксимальных отделов ног, псевдогипертрофия икроножных мышц. Снижение сухожильных рефлексов, снижение мышечного тонуса, мышечная сила в руках 2 балла. Имеются контрактуры в коленных, голеностопных суставах. Со стороны сердечно-сосудистой системы кардиомиопатия.

Приблизительно 55-65% всех случаев ПМД Дюшенна/Беккера обусловлены делециями гена дистрофина различной протяженности, 5 - 10% случаев - дубликациями части гена, у остальных больных имеют место точковые мутации.

Делеции в гене дистрофина распределяются отнюдь неравномерно по его длине, а преимущественно группируются вокруг двух областей гена, образуя так называемые «горячие точки» делеций - в 5-й области гена (экзоны 2 - 20) и в его дистальной части в области экзонов 44 - 53.

Интересно отметить, что проксимальные делеции гена чаще выявляются при семейных формах болезни, тогда как дистальные делеции обычно ассоциированы со спорадическими случаями (т.е. возникшими как результат новой мутации); при выявлении проксимальной делеции гена повторный риск заболевания в семье почти на порядок выше, чем при дистальной (соответственно, 30% и 4%).

Серьезной проблемой при проведении ДНК- диагностики в семьях с ПМД Дюшенна/ Беккера является чрезвычайно высокая частота спонтанных мутаций, что частично может объясняться их гигантским размером.

Предполагается, что около трети всех случаев ПМД Дюшенна/Беккера обусловлены мутациями *de novo*.

**Заключение.** Таким образом, исследования в области молекулярной генетики представляют особую актуальность в связи с высоким удельным весом нейроредитарных заболеваний в общей структуре неврологической патологии, глубокой инвалидизацией больных с прогрессирующей психической и физической дезадаптацией, а также фатальным течением этих в большинстве случаев неизлечимых страданий.

Впервые в популяции города Алмазы и Алматинской области была проведена молекулярно-генетическая диагностика миодистрофии Дюшенна у детей. На сегодняшний день данный метод является единственным профилактическим мероприятием, что тем самым дает возможность для проведения пренатальной диагностики в семьях высокого риска.

Принимая во внимание тот факт, что для основной части заболеваний из данной группы характерно неуклонно прогрессирующее течение и отсутствие эффективных методов лечения, нервно-мышечные болезни следует признать одной из наиболее

актуальных проблем клинической неврологии. Профилактика повторных случаев нервно-мышечных болезней в семьях "высокого риска" вается на сегодняшний день единственным эффективным средством борьбы с этими тяжелыми и нередко фатальными недугами, при том центральное место в системе профилактических мероприятий занимает ДНК-диагностика.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Иллариошкин С.Н., Иванова-Смоленская И.А., Маркова Е.Д. ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование в неврологии. – М.: МИА, 2002. – 259 с.
- 2 Вельтищев Ю.А., Темин П.А. Наследственные болезни нервной системы: руководство для врачей. – М.: Медицина, 1998. – 436 с.
- 3 Иллариошкин С.Н., Иванова-Смоленская И.А. Молекулярные основы прогрессирующих мышечных дистрофий (обзор литературы) // Журн. неврол. психиатр. – 1998. - №10. - С.55-62.
- 4 Balci B., Aurino S., Haliloglu G., Talim B., Erdem S., Akcoren Z., Tan E., Caglar M., Richard I., Nigro V., Topaloglu H., and Dincer P. Calpain-3 mutations in Turkey // Eur JPediatr. – 2006. - №165. – P. 293-298.
- 5 Beedle A. M., Nienaber P. M., and Campbell K. P. Fukutin-related protein associates with the sarcolemmal dystrophin-glycoprotein complex // J Biol Chem. – 2007. - №282. – P. 16713-16717.
- 6 Bengtsson B. O. a. G. T. (1981). Measuring the strength of associations between HLA antigens and diseases // Tissue Antigens. – 1981. - №18. - P. 356-363.
- 7 Bourteel H., Stojkovic T., Cuisset J. M., Maurage C. A., Laforet P., Richard P., and Vermersch P. Phenotypic aspects of FKRP-linked muscular dystrophy type 21 in a series of eleven patients // Rev Neurol. – Paris: 2007. - №163. – P. 189-196.
- 8 Bourteel H., Vermersch P., Cuisset J. M., Maurage C. A., Laforet P., Richard P., and Stojkovic T. Clinical and mutational spectrum of limb-girdle muscular dystrophy type 21 in 11 French patients // J Neurol Neurosurg Psychiatry. – 2009. - №80. – P. 1405-1408.
- 9 Bushby K. M. Diagnostic criteria for the limb-girdle muscular dystrophies: report of the ENMC Consortium on Limb-Girdle Dystrophies // Neuromuscul Disord. – 1995. - №5. – P. 71-74.
- 10 Colombo R. Age estimate of the N370S mutation causing Gaucher disease in Ashkenazi Jews and European populations: A reappraisal of haplotype data // Am J Hum Genet. – 2000. - №66. – P. 692-697.
- 11 Davies K. E., and Nowak K. J. Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2007. - №7. – P. 762-773.
- 12 De Wazieres B., and Dupond J. L. Mitochondrial and metabolic myopathies // Rev Prat. – 2001. - №51. – P. 256-261.
- 13 Todorova A., Kress W., and Mueller C. Novel mutations in the calpain 3 gene in Germany // Clin Genet. – 2005. - №67. – P. 356-358.
- 14 Vainzof M., Ayub-Guerrieri D., Onofre P. C., Martins P. C., Lopes V. F., Zilberztajn D., Maia L. S., Sell K., and Yamamoto L. U. Animal models for genetic neuromuscular diseases // J Mol Neurosci. – 2008. - №34. – P. 241-248.

**Д.Р. Арупова, Е.У. Куандыков**

*С. Ж. Асфендияров атындағы Қазақ Ұлттық медицина университеті*

#### **ҮДЕМЕЛІ БҰЛШЫҚЕТ ДИСТРОФИЯЛАРЫНЫҢ МОЛЕКУЛЯРЛЫҚ-ГЕНЕТИКАЛЫҚ ДИАГНОСТИКАСЫ**

**Түйін:** Жүйке жүйесінің тұқым қуалайтын аурулары (ЖЖТҚА) адамның моногенді аурулар топтарының бірін құрайды. ЖЖТҚА-ның көптеген ауыр прогрессивті ағымдары ол – науқастардың жиі мүгедектенуі, емдеудің тиімді тәсілдерінің болмауы, сондай-ақ аурудың қайталану қауіпі жоғары болуынан ауыртпалық көрген отбасыларға профилактикалық шараларын қолданудың өзекті болуы.

Жергілікті бағытталған профилактикалық шаралардың көлемі мен сипатын жоспарлаудағы негіз болып популяциялы-эпидемиологиялық зерттеудің мәліметтері болуы тиіс. Өйткені, зерттеу мәліметтері таралудың негізін, спектрін, генетикалық түрлілігін, ЖЖТҚА-ның жеке фенотипиялық көріністерінің ерекшеліктерін алуға септік етеді. Бұл мәліметтер ЖЖТҚА бойынша мамандырылған профилактикалық регистрлердің құрылуына негізі болып табылады. Зерттеудің материалдары ретінде науқастардың ДНҚ үлгілері алынды. 5-тен 16-ға дейінгі жас аралықтағы ер жынысты 26 науқасқа зерттеу жүргізілді. Алғаш рет Алматы мен Алматы облысы бойынша балалардағы Дюшенна миодистрофиясына молекулярлық-генетикалық диагностикасы жүргізілді. Бүгінгі таңда аталмыш тәсіл профилактикалық шаралар бойынша жалғыз ғана, осыған орай бұл қауіпі жоғары отбасыларға пренатальді диагностика жасауға мүмкіндік береді.

Бұл топтаға аурулардың жиіленуі мен негізгі бөлігі - тиімді емдеу тәсілдерінің жоқтығы мен ауру ағымының өршуі болып табылатынын ескере келе, жүйке-бұлшықеттік аурулардың клиникалық неврологиядағы ең өзекті мәселе екенін мойындау керек. Жоғары қауіптегі отбасыларда жүйке-бұлшықеттік аурулардың қайталануын алдын алу бүгінгі күнде бұл аурымен күресуде жалғыз тиімді тәсілі болып табылады. Сондай-ақ профилактикалық шаралар жүйесінің ортақ орны - ДНҚ диагностикасы.

**Түйінді сөздер:** үдемелі бұлшықет дистрофиясы, Дюшенна миодистрофиясы, молекулярлық-генетикалық диагностика, жүйке жүйесінің тұқым қуалайтын аурулары

**D.R. Arupova, E.U. Kuandykov**  
*Asfendiyarov Kazakh National Medical University*

#### **MOLECULAR-GENETIC DIAGNOSIS PROGRESSIVE MUSCLE DYSTROPHIES**

**Resume:** Hereditary diseases of the nervous system (NBNS) are one of the most numerous groups of monogenic human diseases. The severe progressive course of many NBNS, the frequent disability of patients, the lack of effective methods of treatment, the high risk of occurrence of repeated cases make the most urgent the implementation of preventive measures in burdened families. The basis for planning the nature and extent of the regionally oriented preventive measures should be data from population-epidemiological studies that provide an idea of the prevalence, spectrum, genetic diversity and specific features of the phenotypic manifestations of individual NBNS. These data form the basis for the establishment of specialized prevention registers for the NBNS, which allow for active prophylactic medical examination of burdened families, and also to plan the volume and nature of medical genetic counseling in certain regions. The material for the study was the DNA samples of the patients. 26 male patients from 5 to 16 years of age were examined. For the first time in the population of the city of Almaty and Alma-Ata region, molecular genetic diagnosis of Duchenne's myodystrophy in children was carried out. To date, this method is the only preventive measure, thereby enabling prenatal diagnosis in high-risk families.

Taking into account the fact that for the main part of the diseases from this group is characterized by a steadily progressing course and the lack of effective methods of treatment, neuromuscular diseases should be recognized as one of the most urgent problems of clinical neuroscience. Prevention of repeated cases of neuromuscular diseases in "high-risk" families is currently the only effective way to combat these severe and often fatal ailments, while the central place in the system of preventive measures is taken by DNA diagnostics.

**Keywords:** progressive muscular dystrophy, Duchenne's myodystrophy, molecular genetic diagnosis, hereditary diseases of the nervous system