

УДК: 575.22; 616.74

*Е.Л.Дадали<sup>1,2</sup>, О.А.Щагина<sup>1</sup>, Т.Е. Тибуркова, О.П.Рыжкова<sup>1</sup>,  
Е.А. Иванова<sup>2</sup>, А.В. Поляков<sup>2</sup>*

**ОСОБЕННОСТИ КЛИНИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ И АЛГОРИТМЫ  
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ГЕНЕТИЧЕСКИ  
ГЕТЕРОГЕННЫХ ВАРИАНТОВ НАСЛЕДСТВЕННЫХ  
ПРОГРЕССИРУЮЩИХ МЫШЕЧНЫХ ДИСТРОФИЙ**

*ГУ Медико-генетический научный центр РАМН, г. Москва;*

*•ГОУ ВПО Российский Государственный медицинский университет Росздрава, г. Москва.*

Генетическая гетерогенность наследственных заболеваний, имеющих сходные клинические проявления, является одной из актуальных, и вместе с тем, сложных проблем клинической генетики. Под генетической гетерогенностью наследственных болезней понимают феномен, когда клинически единое заболевание может быть обусловлено мутациями в разных генах (локусная гетерогенность) или, напротив, когда мутации в одном гене обуславливают различные по тяжести клинические формы одного заболевания, или разные по клиническим проявлениям заболевания (аллельная гетерогенность). К настоящему времени выявлено существование генетической гетерогенности практически для всех групп нейрогеридитарной патологии. Одной из таких групп наследственных болезней безусловно, являются прогрессирующие мышечные дистрофии (ПМД). На сегодняшний день идентифицировано около двух десятков генов, ответственных за возникновение генетических вариантов этой группы заболеваний (Табл. 1) [14].

Таблица 1.

Генетические варианты прогрессирующих мышечных дистрофий.

Название болезни	Ген	Белок
Несиндромальные врожденные ПМД		
Врожденная МД с недостаточностью мерозина	<i>LAMA2</i>	α-цепь Ламирина
Врожденная МД тип 1С	<i>FKRP</i>	Фукутин-связанный протеин
Врожденная МД с мутациями в ITGA7	<i>ITGA7</i>	Интегрин α7
Врожденная МД с ригидностью позвоночника	<i>SEPN1</i>	Селенопротеин N
Врожденная МД Ульриха	<i>COL6A1/2</i>	α1 и α2 цепи коллагена 6
	<i>COL6A3</i>	α3 цепь коллагена 6
Синдромальные врожденные ПМД		
Тип Фукуяма	<i>FCMD</i>	Фукутин
Мышечно-глазо-мозговой синдром	<i>POMGNT1</i>	Протеин O-маннозид рi,2-N-ацетилглюкозилтрансфераза 1

Название болезни	Ген	Белок
Синдром Уолкера-Варбурга	<i>POMT1</i>	Протеин О-маннозилтрансфераза 1
	<i>POMT2</i>	Протеин О-маннозилтрансфераза 2
Врожденная мышечная дистрофия тип 1D	<i>LARGE</i>	Гликозилтрансфераза- подобный белок
Аутосомно-доминантные ПМД		
ПКМД 1A	<i>TTID</i>	Титин
МД Эмери-Дрейфуса (ПКМД 1B)	<i>Lamin A/C</i>	Ламю
ПКМД 1C	<i>CAV3</i>	Кавеолин 3
ПКМД 1D	<i>неизвестен (7q)</i>	
ПКМД 1E	<i>неизвестен (6q22)</i>	
Аутосомно-рецессивные ПМД		
a,p,y,5 саркогликанопатии	<i>SGCA, SGCB, SGCG, SGCD</i>	саркогаиканы
Кальпаинопатии	<i>CAPN3</i>	Кальпаин 3
Дисферлинопатии (дистальная миопатия Миоши)	<i>DYSF</i>	Дисферлин
Телетониопатии	<i>TCAP</i>	Телетин
LGMD2H	<i>TH32</i>	
LGMD2I	<i>FKRP</i>	Фукугиллинсвязанный протеин
LGMD2J	<i>TTN</i>	Титин
LGMD2K	<i>POMT1</i>	протеин О-Маннозилтрансфераза
X-сцепленные ПМД		
МД Дюшена	<i>DMD</i>	Дистрофин
МД Беккера	<i>DMD</i>	Дистрофин
МД Эмери-Дрейфуса	<i>Emerin</i>	Эмерин

Большинство белковых продуктов этих генов являются структурными белками, локализованными в саркомере, саркомере, ядерной оболочке мышечного волокна, а также в межклеточных пространствах, и обеспечивают нормальное функционирование различных этапов сложного процесса мышечного сокращения. Часть генов, ответственных за возникновение ПМД, кодирует белки, выполняющие функции ферментов, обеспечивающих синхронность протекания биохимических процессов при сокращении и расслаблении мышечного волокна и участвующих в процессах сигнальной трансдукции. Таким образом, значительное сходство клинических симпто-

мов генетически гетерогенных форм наследственных ПМД объясняется единством функций белковых продуктов генов, мутации в которых ответственны за их возникновение. Идентификация локусной и аллельной гетерогенности наследственных мышечных дистрофий позволила, в ряде случаев, объяснить механизмы наблюдаемого ранее межсемейного полиморфизма клинических проявлений отдельных нозологических форм. Однако причины внутрисемейного полиморфизма, характеризующегося различиями клинических проявлений заболевания у пораженных членов семьи, имеющих одну и ту же мутацию в гене, окончательно не выяснены [13].

Таким образом, для практикующего врача невролога консультирование больного зачастую заканчивается на этапе диагностики нозологической формы наследственного заболевания, в то время как для врача генетика диагностики определенной нозологической формы бывает не достаточно, так как требуется идентификация определенного генетического варианта с использованием молекулярно-генетических методов. Выявление генетического варианта наследственной патологии необходима в силу ряда причин: 1) определения особенностей клинических проявлений и течения заболевания; 2) установление типа наследования генетического варианта и расчет повторного риска рождения больного ребенка в отягощенной семье; 3) планирование профилактических мероприятий в отягощенной семье, направленных на предотвращение рождения больного ребенка, основным из которых является дородовая диагностика на ранних сроках беременности [1].

В зависимости от возраста манифестации все ПМД делятся на врожденные, детские, юношеские и взрослые [6]. Врожденные ПМД манифестируют с рождения и характеризуются выраженной задержкой раннего моторного развития при сохранности когнитивных функций. Остальные группы ПМД возникают после периода нормального моторного развития и характеризуются прогрессирующей гипотонией, гипотрофией, снижением мышечной силы и угасанием сухожильных рефлексов (Рис. 1).



**РИС. 1. Классификация прогрессирующих мышечных дистрофий.**

ПМД, возникающие после периода нормального моторного развития делятся на несколько групп в зависимости от преимущественной топографии мышечного поражения. Выделяют окуло-фарингеальные, дистальные, поясно-конечностные, лице-плече-лопаточные и лопаточно-перонеальные.

Все эти группы включают несколько генетических вариантов, для большинства из которых идентифицированы гены и определена локализация и функции их белковых продуктов. Наибольшее количество генетических вариантов описано для поясно-конечностных мышечных дистрофий (ПКМД), которые подразделяются в зависимости от типа наследования на три подгруппы: с аутосомно-доминантным, аутосомно-рецессивным и X-сцепленным рецессивным типом наследования. Группа ПКМД, наследующихся аутосомно-доминантно формируют 1 тип, который включает семь генетических вариантов, обозначаемы буквами английского алфавита (от А - до G). ПКМД 2 типа включает 13 генетических вариантов (от А - до М) с аутосомно-рецессивным типом наследования. Третья группа ПКМД включает два генетических варианта с X-сцепленным-рецессивным типом наследования - ПМД Дюшенна/Беккера и ПМД Эмери-Дрейфуса[5].

Среди генетических вариантов ПКМД, гены которых картированы на аутосомах, 85% наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Их частота составляет в среднем 1:15 000 населения. На долю заболеваний с аутосомно-доминантным типом наследования приходится не более 15% случаев [2] (Рис. 2).

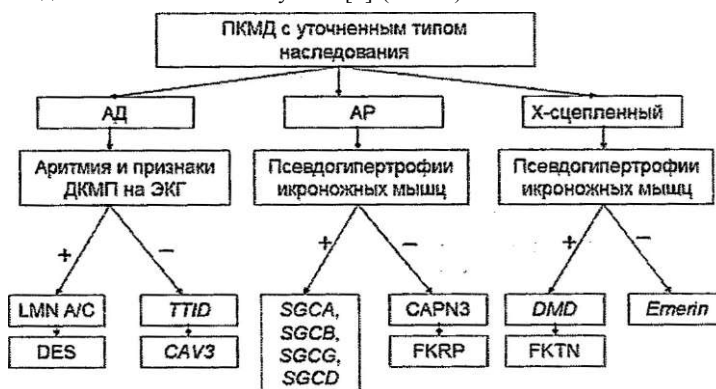


Рис. 2. Алгоритм обследования больных с установленным типом наследования ПКМД.

ПКМД с X-сцепленным рецессивным типом наследования - одна из наиболее частых нервно-мышечных патологий у лиц мужского пола. Так, частота ПМД Дюшенна/Беккера составляет 1: 3500 новорожденных мальчиков [1].

Большинство случаев ПКМД с аутосомно-рецессивным типом наследования обусловлены мутациями в генах, кодирующих калпаин, дисферлин и группу саркогликанов, в связи с чем, выделяют калпаинопатии, саркогаиканопатии, дисферлинопатии и т.д. До 50% всех ПКМД с аутосомно-рецессивным типом наследования составляет ПКМД 2А типа [4,12,14], являющаяся кальпаинопатией, поскольку вызвана мутациями в гене *CAPN3*, кодирующем калпаин - фермент суперсемейства  $Ca^{2+}$ -зависимых цистеиновых протеаз. Основное количество калпаина 3 типа локализовано в структуре саркомера, где он связан с титаном, крупным белком, соединяющим миозин с белками Z-диска и являющимся ключевым компонентом сборки и функционирования

поперечно-полосатых мышц человека. Показано, что калпаин 3 влияет на функционирование титина через его протеолитическое расщепление [2, 8, 10].

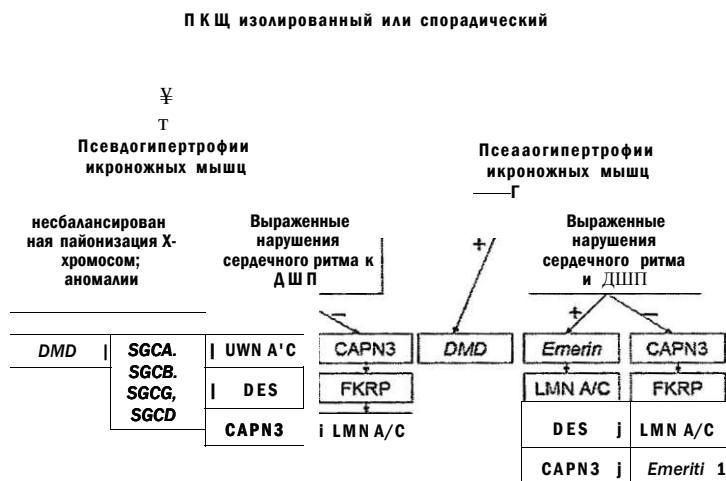
Исследованиями последних лет показано, что мутации в гене калпаина распределены неравномерно. Показано, что более 60% мутаций в гене калпаина локализовано в 4, 5, 10, 11, 12, 20, 21 и 22, видимо, эти экзоны кодируют наиболее важные для функционирования участки калпаина-3. Кроме того, в отдельных популяциях описаны мажорные мутации. Такой мутацией в славянских популяциях является 550delA [6,7,14].

Клинические проявления ПКМД 2А типа полностью соответствуют классическому описанию ПМД Эрба-Ротта и характеризуются симметричным поражением мышц плечевого и тазового поясов и проксимальных групп мышц ног и рук. Заболевание манифестирует в широком возрастном диапазоне от 2 до 40 лет, однако наиболее типичным возрастом манифестации является период от 8 до 16 лет. Вовлечение в процесс мышц дистальных отделов конечностей, лица, глазодвигательных мышц и сердечной мышцы не характерно. Уровень КФК повышен в 5-20 раз по сравнению с контролем. Больные достаточно долго сохраняют способность к самостоятельной ходьбе и пользуются инвалидным креслом только в 4-5 десятилетия жизни. Таким образом, при наличии больного с типичными клиническими проявлениями ПМД Эрба-Ротта в первую очередь необходимо исследовать мутацию в гене калпаина [6, 12].

Другой группой аутосомно-рецессивных ПКМД являются саркогликанопатии. Известно 4 типа саркогликанов (альфа, бета, гамма, дельта) тесно связаны с дистрофином, образуя функционально единый дистрофин-саркогликановый комплекс. Нормальное функционирование этого комплекса обеспечивает устойчивость саркомеры мышечного волокна при мышечном сокращении. Нарушение структуры и функции даже одного белка этого комплекса приводит к его распаду и возникновению клинической картины псевдогипертрофических ПМД, к которым относится ПМД Дюшенна, а также ПКМД 2С, D, E и F типов обусловленных мутациями в генах альфа, бета, гамма и дельта саркогликанов, соответственно [9]. Единство функций этих белков приводит к возникновению сходных клинических проявлений этих аутосомно-рецессивных ПКМД и ПМД Дюшенна/Беккера с X-сцепленным рецессивным типом наследования. В связи с этим, дифференциальная диагностика этих групп заболеваний у больных мужского пола затруднена и оказывается возможной только при проведении комплексного обследования больного (Рис. 3).

На первом этапе проводится ДНК анализ, направленный на поиск частых мутаций в гене дистрофина. Этими мутациями являются делеции, которые составляют около 60% и дупликации, на долю которых приходится от 5% до 7% всех мутаций в гене дистрофина. Таким образом, при идентификации делеций или дупликаций в гене дистрофина диагноз ПМД Дюшенна/Беккера является установленным. В остальных случаях у больных мужского пола необходимо проводить дифференциальную диагностику с псевдогипертрофическими вариантами саркогликанопатий. Эта дифференциация возможна на основании проведения трех видов обследования :1) генеалогического анализа; 2) определения уровня активности креатинфосфокиназы у матери больного; 3) иммуногистохимического анализа биоптатов мышц. Диагноз ПМД Дюшенна/Беккера подтверждается в том случае, если анализ родословной четко свидетельствует в пользу X-сцепленного рецессивного типа наследования, повышенный

уровень креатинфосфокиназы у матери свидетельствует в пользу гетерозиготного носительства ею мутации в гене дистрофина или носительство можно подтвердить или опровергнуть при иммуногистохимическом анализе (обнаруживается отсутствие или снижение) дистрофиновых волокон [1].



**Рис. 3. Алгоритм обследования больных с неустановленным типом наследования ПКМД.**

Особые сложности возникают при расчетах повторного риска рождения больного ребенка в семьях отягощенных ПМД Дюшенна, в связи с трудностями определения вероятности носительства матерью больного мутации в гене дистрофина. Определение у нее активности креатинфосфокиназы в плазме крови не является абсолютно достоверным методом, так как показано, что приблизительно треть всех облигатных носительниц не имеет, характерного для гетерозигот, повышения уровня этого фермента. Использование методов ДНК анализа, также не всегда оказывается возможным.

При четком установлении генотипа матери пробанда и её родственниц расчеты риска не представляют сложностей и проводят на основании типов образующихся гамет. Наибольшие сложности возникают при наличии единственного больного в семье. Традиционно, при расчетах вероятности носительства мутации в гетерозиготном состоянии у родственниц пробандов применяют теорему Байеса. В качестве априорной вероятности носительства женщиной мутации на одной из X-хромосом принимают показатель  $4c$  (где  $c$  - частота мутирования на гамету на поколение. Этот показатель складывается из частот мутирования в женских ( $2c$ ) и мужских ( $2v$ ) гаметах. Соответственно, при равной частоте мутирования в женских и мужских половых клетках и фертильности больных  $f=0$  этот показатель принимается равным  $4c$ . Используя этот показатель в качестве априорной вероятности при наличии единственного больного в семье вероятность гетерозиготного носительства у матери пробанда оказывается  $2/3$

(66%) и риск повторного рождения больного ребенка составит 33%. Однако исследование ряда авторов показали, что для ряда генов, приводящих к X-сцепленным рецессивным заболеваниям, частота мутаций в женских и мужских гаметах существенно различается. Показано, что возникновение точковых мутаций в гене дистрофина *de novo* в гаметах дедушек пробандов происходят в 40 раз чаще, чем в гаметах бабушек по материнской линии. Принимая во внимание это обстоятельство, риск гетерозиготного носительства мутации в гене дистрофина у матерей пробандов с точно установленным диагнозом ПМД и не имеющих делеции в гене дистрофина, значительно выше, чем считалось ранее.

Кроме того, показано, что примерно в 1% семей с единственным больным у матерей наблюдается явление терминального мозаицизма, т.е. присутствия среди яйцеклеток клонов с нормальным и мутантным геном в различных соотношениях, следовательно, в данной ситуации риск рождения больного ребенка у женщины-носительницы существенно повышается. Исходя из всего вышесказанного, можно сделать вывод, что прямая или косвенная ДНК-диагностика может рекомендоваться всем матерям больных с диагнозом ПМД при последующих беременностях [1].

Другим вариантом ПКМД с X-сцепленным рецессивным типом наследования является ПМД Эмери-Дрейфуса. Особенности клинических проявления этого варианта являются рано возникающие и прогрессирующие нарушения сердечного ритма, контрактуры голеностопных, локтевых и межпозвоночных суставов в области шейного отдела позвоночника [15].

Врожденные ПМД (ВМД) делятся на синдромальные и несиндромальные. Синдромальные варианты врожденных ПМД включают болезнь Уолкера-Варбурга, мышечно-глазо-мозговой синдром и ПМД Фукуяма [9]. Все эти варианты наследуются аутосомно-рецессивно и имеют специфические клинические симптомы, характеризующиеся сочетанием врожденной ПМД с пороками развития мозга и структур глаза, имеют тяжелое клиническое течение и выраженную олигофрению. Пороки развития мозга у больных с синдромальными вариантами врожденных ПМД различны, основными из них являются нарушение миграции нейронов, отсутствие астроцитов, лисенцефалия и прогрессирующая гидроцефалия. У 50% больных возникают судороги. Поражения глаз характеризуются миопией, атрофией дисков зрительных нервов, микрофтальмией, косоглазием, катарактами и патологией сетчатки. Таким образом, клиническая картина этой группы заболеваний достаточно специфична. Алгоритм их молекулярно-генетической диагностики может быть основан на различиях в тяжести клинических проявлений и частотах встречаемости в различных популяциях (Рис. 4).

Наиболее тяжело протекает синдром Уолкера-Варбурга, наименее тяжело мышечная дистрофия Фукуямы. Кроме того мышечная дистрофия Фукуямы, наиболее распространенная в Японии и достаточно редко встречается в европейских популяциях, а мышечно-глазо-мозговой синдром главным образом встречается в финской популяции. Таким образом, при наличии вышеперечисленной клинической симптоматики у больного диагностический поиск следует начинать с идентификации мутации в генах протеин О-манозилтрансферазы 1 и 2 типов, ответственных за возникновение болезни Уолкера-Варбурга.

Следующей группой ВМД являются пять несиндромальных вариантов ВМД [14], обусловленных мутациями в генах, кодирующих мерозин, интегрин, фукутинс-

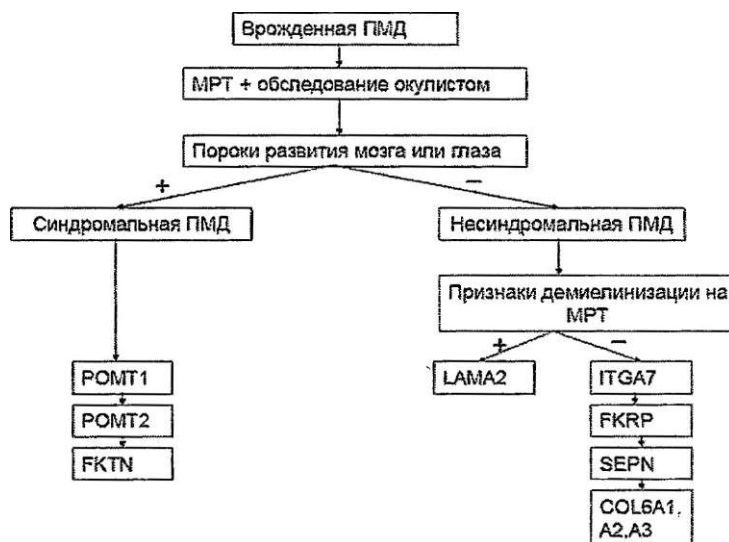


Рис. 4. Алгоритм обследования больных с врожденными ПМД.

вязанный протеина, сеяенопротеин и альфа 1, 2 и 3 цепей коллагена 6 типа. Как и в других группах мышечных дистрофий при диагностике этой группы заболеваний учитывается частота встречаемости и особенности клинических проявлений. Наиболее распространенным вариантом несиндромальных врожденных ПМД является мерозин-негативный. На его долю приходится более 50% всех заболеваний этой группы. Особенностью клинических проявлений этого генетического варианта является раннее возникновение контрактур в крупных суставах, а также наличие участков лейкомаляции в перивентрикулярных отделах головного мозга. При наличии таких клинических проявлений, с учетом частоты встречаемости этого варианта ВМД его диагностика проводится в первую очередь. Частота других вариантов врожденных ПМД до настоящего времени не изучена, возможно, они встречаются с равной частотой. Для создания диагностического алгоритма оставшихся вариантов используются особенности их клинических проявлений. Так ВМД, обусловленная мутациями в гене фукутин-связанного протеина, являющегося ферментом пшкозилтрансферазой, в большинстве случаев сопровождается врожденной гипертрофией мышц, особенно икроножных, задержкой психомоторного развития и значительным повышением уровня активности КФК. Для ВМД Ульриха характерно раннее возникновение контрактур крупных суставов, а для синдрома ригидного позвоночника - сколиозы и ограничения подвижности позвоночника, нормальный уровень КФК и не резко выраженные признаки первично-мышечного поражения при проведении ЭМГ.

На основании результатов собственных исследований и анализа литературных данных нами представлены алгоритмы диагностики прогрессирующих мышечных дистрофий.



## ЛИТЕРАТУРА

1. Подагова Е.В., Дадали Е.И., Мальмберг С. А. и др. Особенности диагностики псевдогипертрофических вариантов поясно-конечностных прогрессирующих мышечных дистрофий// Неврологический журнал. - 2007. - №1.- с.24-28
2. Anderson LV, Harrison RM, Pogue R. et al. Secondary reduction in calpain 3 expression in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B and Miyoshi myopathy (primary dysferlinopathies)// *Neuromuscul Disord*-2000.-Vol.10.-P. 553-55
3. Beckmann J.S., Richard I., Hillaire D. et al. A gene for limb girdle muscular dystrophy maps to chromosome 15 by linkage // *CR Acad Sci IO*.-1991.-Vol. 312 - P. 141-148.
4. Balci B., Aurino S., Haliloglu G. et al. Calpain-3 mutations in Turkey // *Eur J Pediatr* - 2006. - Vol. -165- P. 293-298.
5. Bun Yaou R., Toutain A., Arimura T. et al. Multitissular involvement in a family with LMNA and EMD mutations: role of digenic mechanism? // *Neurology* 68: 1883-1894, 2007.
6. Bushby KM. Diagnostic criteria for the limb-girdle muscular dystrophies - report of the ENMC Consortium on Limb-Girdle Dystrophies // *Neuromuscul Disord*. - 1995 Jan.- V. 5(1).-P. 71-4.
7. Canki-Klain N., Milic A., Kovac B. Prevalence of the 550delA mutation in calpainopathy (LGMD 2A) in Croatia // *Am J Med Genet*.- 2004 Mar 1. - V. 125(2) .- P. 152-156.
8. Chae J., Minami N., Jin Y. Calpain 3 gene mutations. - genetic and clinico-pathologic findings in limb-girdle muscular dystrophy // *Neuromuscul Disord* .- 2001 Sep 1.- V. (6-7) .- P. 547-555.
9. Cotarelo RP., Valero M.C., Prados B. et al. Two new patients bearing mutations in the fukutin gene confirm the relevance of this gene in Walker-Warburg syndrome. // *Clin. Genet*. 73: 139-145, 2008.
10. Guyon JR, Kudryashova E, Potts A, Dalkilic I, Brosius MA, Thompson TG, Beckmann JS, Kunkel LM, Spencer MJ. Calpain 3 cleaves filamin C and regulates its ability to interact with gamma- and delta-sarcoglycans // *Muscle Nerve* - 2003 Oct. - 28(4). - P.472-83.
11. Kawai H., Akaie M., Kunishige M. et al. Clinical, pathological, and genetic features of limb-girdle muscular dystrophy type 2A with new calpain 3 gene mutations in seven patients from three Japanese families // *Muscle Nerve* - 1998 - V.21.- P. 1493-501.
12. Paula E, Vainzof M., Passos-Bueno M.R et al. Clinical variability in Calpainopathy.- what makes the difference? // *Eur J Hum Genet*-2002-V.10-P.825-832.
13. Pogoda T.V., Krakhmaleva I.N., Lipatova N.A. et al. High incidence of 550delA mutation of CAPN3 in LGMD2 patients from Russia // *Hum Mut* - 2000 - V. 15 - P.295.
14. Vigliano P., Dassi P., Blasi C. et al. LAMA2 stop-codon mutation: merosin-deficient congenital muscular dystrophy with occipital polymicrogyria, epilepsy and psychomotor regression // *Eur. J. Paediatr. Neurol*. - 2009.-V. 13.-P. 72-76.
15. <http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/time/hmsn.html>. // Сайт центра нервно-мышечных заболеваний (NEUROMUSCULAR DISEASE CENTER).