

УДК: 575.113:616-007.17-053

СПЕКТР МУТАЦИИ ГЕНА ДИСТРОФИНА У ДЕТЕЙ С ПРОГРЕССИРУЮЩИМИ МЫШЕЧНЫМИ ДИСТРОФИЯМИ ДЮШЕННА/БЕККЕРА В УЗБЕКИСТАНЕ

Маджидова Ё.Н., Омонова У.Т.

Ташкентский педиатрический медицинский институт

Резюме

Проведена прямая ДНК-диагностика 99 пациентам с ПМДД/Б из 86 семей, 92 (92,9%) пациента с ПМД Дюшенна, 7 (7,1%) пациентов – с ПМД Беккера. Анализ проводился по 20 экзонам гена дистрофина - промоторная область, 3, 4, 6, 8, 13, 17, 19, 32, 42, 43, 44, 45, 47, 48, 50, 51, 52, 53, 60 экзоны. Косвенная диагностика проведена в 21 семье, отягощённой ПМДД/Б, с применением внутригенных высокополиморфных маркеров, расположенных в 45-м (STR-45), 49-м (STR-49), 50-м (STR-50) интронах гена. Выявлены мутации в 18 экзонах из 20 исследованных, что обуславливает необходимость дальнейшего изучения делеционного спектра мутаций в гене дистрофина в нашей популяции. Гетерозиготный генотип STR-45 (CA)28 является высоко информативным при выявления гетерозиготных носительниц поврежденного гена дистрофина среди родственниц больного ПМДД/Б в Узбекистане.

Ключевые слова: прогрессирующая миодистрофия Дюшенна и Беккера, прямая ДНК диагностика, косвенная ДНК диагностика, дети.

ЎЗБЕКИСТОНДА ДЮШЕН/БЕККЕР ЗЎРАЙИБ БОРУВЧИ МУШАК ДИСТРОФИЯСИ БИЛАН ОҒРИГАН БОЛАЛАРДА ДИСТРОФИН ГЕНИНИНГ МУТАЦИЯ СПЕКТРИ

Маджидова Ё.Н., Омонова У.Т.

Тошкент педиатрия тиббиёт институти

Резюме

86 оиладан Дюшен/Беккер зўрайиб борувчи мушак дистрофияси (Д/БЗБМД) билан оғриган 99 беморда, Дюшен ЗБМД билан оғриган 92 (92,9%) беморда, Беккер ЗБМД билан оғриган 7 (7,1%) беморда бевосита ДНК-таъхис қилинди. Таъхис дистрофин генининг 20 та – промотор соҳа, 3,4,6,8,13,17,19,32,42,43,44,45,47,48,50,51,52,53,60 экзонлари бўйича амалга оширилди. Билвосита диагностика Д/БЗБМД таъхиси қайд этилган 21 оилада генининг 45-(STR-45), 49-(STR-49), 50-(STR-50) интронларида жойлашган ген ички юқори полиморф маркерлардан фойдаланиб амалга оширилди. 20 та экзондан 18 экзонда мутациялар аниқланди, бу бизнинг популяциядаги дистрофин генида мутациялар делецияли спектрини келгусида ўрганиш зарурлигини таъқоза этади. Гетерозиготали генотип STR-45-(CA)28 Ўзбекистонда Д/БЗБМД билан оғриган беморларнинг қариндошлари ўртасида шикастланган дистрофин гени гетерозиготали таъхисчиларни аниқлашда юқори информатив аҳамиятга эга.

Калит сўзлар: Дюшен ва Беккер зўрайиб борувчи мушаклар дистрофияси, бевосита ДНК-диагностика, билвосита ДНК-диагностика, болалар.

THE SPECTRUM OF DYSTROPHIN GENE AT CHILDREN WITH PROGRESSIVE MUSCULAR DUCHENE/BECKER'S DYSTROPHY IN UZBEKISTAN

Madgidova Yo.N., Omonova U.T.

Tashkent Pediatric Medical Institute

Resume

The direct DNA-diagnosis of 99 patients with progressive and muscular dystrophy by Duchene/Becker (PMDD/B) from 86 families, 92 (92, 9%) patients with PMD Duchene, 7 (7, 1%) patients with PMD Becker. The analysis was performed by 20 exons of dystrophin gene in promotor area, 3,4,6,8,13,17,19,32,42,43,44,45,47,48,50,51,52,53,60 exons. Indirect diagnosis was carried out in 21 family being burden with PMDD/B, and use intragenic high polymorphic markers those were located in 45 (STR-45), 49 (STR-49), 50(STR-50) introns of gene. The mutations were revealed in 18 exons from 20 studies that caused the necessity of further research of deletion spectrum for mutation in gene of dystrophin in our population. Heterozygous genotype STR-45 (CA)28 was high informative at revealing heterozygous carriers of damaged gene of dystrophine among patient's relative of PMDD/B in Uzbekistan.

Key words: progressive muscular dystrophy by Duchene and Becker, direct DNA-diagnosis, indirect DNA-diagnosis, children.

Актуальность

Прогрессирующие мышечные дистрофии Дюшенна и Беккера (ПМДД/Б) – наиболее распространенные наследственные заболевания нервно-мышечной системы у детей [1,3]. По данным экспертов Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) частота ПМДД составляет 1:3500 и ПМДБ 1:20000 живорожденных мальчиков [2,4,5]. Наряду с развитием в Республике Узбекистан современной медико-генетической службы и повышением качества оказываемых услуг в области профилактики и

ранней диагностики врождённых и наследственных заболеваний имеется ряд задач, ожидающих своего решения, в том числе по медико-генетическому консультированию наследственных заболеваний нервно-мышечной системы у детей.

Цель исследования. Изучить спектр мутации гена дистрофина в семьях больных с ПМДД/Б в Узбекистане

Материал и методы

Молекулярно-генетическая часть данной работы выполнена в отделе молекулярной медицины и клеточных

технологий НИИГ и ПК МЗ РУз.

Молекулярно-генетическое обследование проводилось методами прямой и косвенной ДНК-диагностики. Прямая ДНК-диагностика проводилась путем детекции 20 частых делеций гена дистрофина больным и беременным из отягощенных по ПМД/Б семей, вынашивавших плод мужского пола. Косвенная ДНК-диагностика проводилась с исследованием внутригенных высокополиморфных маркеров, расположенных в 45-м (STR-45), 49-м (STR-49), 50-м (STR-50) интронах гена для определения носительства мутантного гена среди родственников пробанда. Прямая ДНК-диагностика проведена 99 пациентам с ПМД Д/Б из 86 семей, 92 (92,9%) пациентам с ПМД Дюшенна, 7 (7,1%) пациентам – с ПМД Беккера. Анализ проводился по 20 экзонам гена дистрофина - промоторная область, 3, 4, 6, 8, 13, 17, 19, 32, 42, 43, 44, 45, 47, 48, 50, 51, 52, 53, 60 экзоны. Косвенная диагностика проведена в 21 семье, отягощенной ПМД-Д/Б, с применением внутригенных высокополиморфных маркеров, расположенных в 45-м (STR-45), 49-м (STR-49), 50-м (STR-50) интронах гена.

Геномную ДНК из образцов периферической крови (Vacutainer Becton Dickinson International с ЭДТА) выделяли с использованием набора для выделения ДНК

DIAtom™ DNA Prep100 ООО «Центр молекулярной генетики» (Москва) в соответствии с инструкцией. Амплификацию проводили с помощью термоциклеров GeneAmp PCR-system 2720 (Applied Biosystems, США) с использованием наборов DMD-del и DMD-CA (ООО «Центр молекулярной генетики», Москва).

Результат и обсуждения

По результатам молекулярной диагностики у 35 пациентов (35,4%) из 32 семей (37,2%) делеции не обнаружены, а у 64 пациентов (64,6%) из 54 семей (62,8%) были выявлены делеции гена дистрофина различной длины – от одного до девяти экзонов: в 70,4% семьях верифицировались протяжённые делеции (44 пациента), делеции одного экзона встречались в 29,6% семьях (20 пациентов).

Мутации гена дистрофина, обнаруженные в 4 семьях с родственными браками, характеризовались делециями одного экзона в дистальном районе 3'-конца (делеции 48, 50 и 53 экзонов), причем в 3 семьях мышечная дистрофия Дюшенна определялась в данном поколении впервые (рис.1). Мутаций de novo в наших исследованиях встречались почти в 2 раза реже по сравнению с выявляемостью семейных случаев заболеваний по «горячим точкам» гена дистрофина (32,6% против 67,4%).

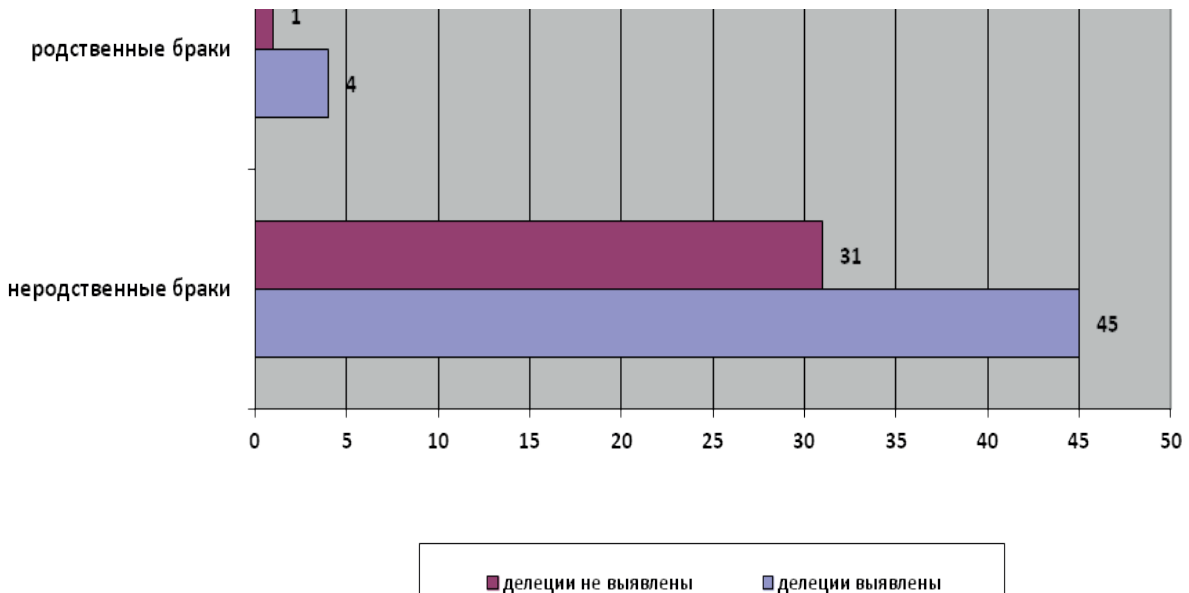


Рис.1. Частота родственных браков в семьях с ПМБ Д/Б

При анализе делеций наиболее часто выявлялись делеции в дистальной части гена дистрофина, что составляло 79,6% от всех выявленных мутаций в семьях: 50 экзон – в 24 случаях, 51 экзон- в 22 случаях, 52 экзон – в 16 случае, 48 экзон – в 17 случаях, 53 экзон – в 11 случаях; 32 экзон – 1;

42 экзон – 1; делеций промоторной зоны и 60 экзона не было выявлено. При проксимальных мутациях чаще встречались делеции 19 (в 7 случаях), 6 (в 7 случаях), 4 (в 6 случаях) и 17, 13, 8 в равных количествах (в 5 случаях соответственно) экзонов (рис.2).

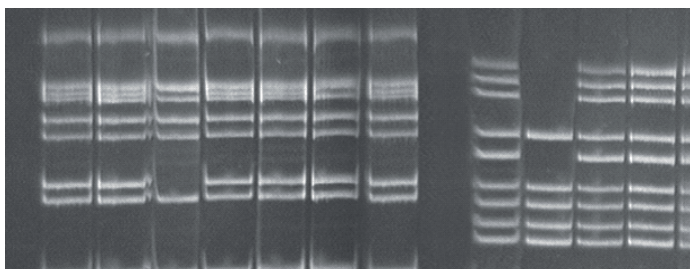


Рис. 2. Результаты мультиплексной ПЦР диагностики гена дистрофина на образцах ДНК у 7 больных с ПМДД/Б.

При спорадических случаях и семейных формах в большинстве случаев чаще выявлялись делеции в дистальной части гена дистрофина – 3'-конце (делеция

40-60 экзонов), почти в 3,6 раза чаще по сравнению с частотой встречаемости проксимальных делеций гена дистрофина в 5'-конце (делеции 3-19 экзонов) (рис. 3).

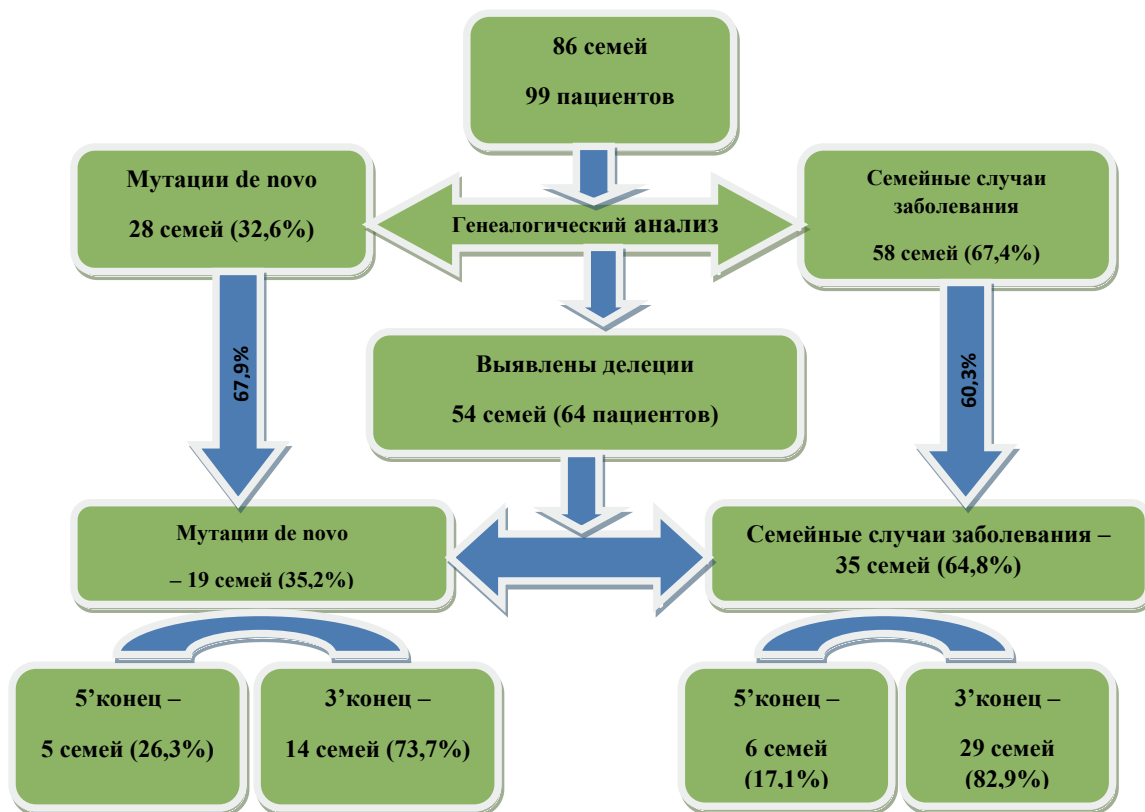


Рис. 3. Соотношение мутаций de novo и семейных случаев заболеваний по «горячим точкам» гена дистрофина.

Косвенная ДНК-диагностика с применением внутригенных высокополиморфных маркеров, расположенных в 45-м (STR-45), 49-м (STR-49), 50-м (STR-50) интронах гена, была проведена 61 родственнице из 21 семьи, отягощённой по ПМДД/Б. Из 21 семьи в 33,3% (7 семей) при проведении прямой ДНК-диагностики делеции в гене дистрофина не были выявлены, в 14,3% (3 семьи) – были выявлены делеции в 5'-конце, в 52,4% (11 семей) – были выявлены делеции в 3'-конце.

Проведен анализ сцепленности STR-45, STR-49 и STR-50 локусов с делецией экзонов гена DMD: всего исследовано 26 здоровых хромосом без делеций (13 неродственных женщин) и 43 хромосомы больных с делецией гемизигота по STR. Выявлена явная тенденция к увеличению уровня гетерозиготности женщин по STR-45, с наличием делеции X-хромосом по сравнению с женщинами с отсутствием делеции X-хромосом.

Уровень гетерозиготности STR-45 в X - хромосомах с отсутствием делеции составил 23,1%, а в группе с наличием делеции 41,9% ($\chi^2=2,5$; $P=0,1$; $OR=2,4$; 95% CI 0,8028- 7,175). Различие в индексе гетерозиготности по локусу STR-49 в X- хромосомах с и без делеции оказалось значимым и составило 34,9% и 11,5%, соответственно ($\chi^2=4,6$; $P=0,03$; $OR=4,1$; 95% CI 1,058-15,9). Уровень сцепленности гетерозигот по локусу STR-49 с делецией экзонов гена DMD оказался в 4,1 раза значимо выше по сравнению с гетерозиготами данного локуса с отсутствием делеции. Частота полиморфного локуса STR-50 в X- хромосомах с наличием и отсутствием делеции составила 23,2% и 15,4%, соответственно ($\chi^2=0,6$; $P=0,4$; $OR=1,7$; 95% CI 0,464-5,987). При этом различие в частоте в сравниваемых группах X-хромосом оказалось недостоверным (табл.1).

Таблица 1

Частота распределения делеции экзонов гена DMD и STR в группах пациентов

Всего информативных результатов по STR	STR 45	STR 49	STR 50	Всего
X- хромосомы с отсутствием делеции	6 (23,1%)	3 (11,5%)	4 (15,4%)	26 хром
X- хромосомы с наличием делеции	18 (41,9%)	15 (34,9%)	10 (23,2%)	43 хром

Как видно из таблицы, выявлена тенденция к увеличению уровня гетерозиготного состояния в хромосомах с наличием дистальных мутаций по сравнению с проксимальными ($\chi^2=1,8$; $p=0,2$). Из обследованных 12 женщин носительниц проксимальной мутации у 7 (58,3%) выявлен гетерозиготный и у 5 (41,2%) гомозиготный генотип по STR-45. Гетерозиготность мультиаллельных STR-45, STR-49 и STR-50 локусов в подгруппах женщин с проксимальными и дистальными делециями гена дистрофина составила 22,7% и 77,3%, соответственно.

Для определения уровня информативности, т.е. гетерозиготности динуклеотидного (CA)28 повтора STR-45 гена дистрофина нами были исследованы 44 неродственных здоровых X-хромосом. Наблюдаемая частота гетерозиготности данного маркера составила – 59,1% (0,59;

26/44) (табл.2).

Для гетерозиготного генотипа полиморфизма STR-45 выявлено, что наблюдаемая частота гетерозигот (Hobs) статистически значимо выше по сравнению с ожидаемым N_{exp} рассчитанной по закону Харди-Вайнберга (0,59 против 0,42%, соответственно, $\chi^2=3,9$; $p=0,049$). Коэффициент отклонения F фактической гетерозиготности от теоретической составил +0,4.

Для STR-45 (CA)28 показатель D оказался положительным и находится >0. Значение Hobs находится близко к показателю 0,6 что свидетельствует о высоком уровне информативности данного микросателлитного полиморфизма для выявления гетерозиготного носительства и пренатальной ДНК-диагностики в семьях высокого риска ПМД/Б.

Таблица 2

Ожидаемые и наблюдаемые частоты распределения генотипов по РХВ генетического маркера STR-45(CA)28

Генотипы	Частота генотипов		χ^2	P
	Наблюдаемая N_{obs}	Ожидаемая N_{exp}		
-/-	0,41	0,5	0,34	0,049
-/+	0,59	0,42	1,6	
+/+	0,00	0,09	1,92	
Всего	1,0	1,0	3,9	

Микросателлитные полиморфизмные повторы (CA)24 и (AC)16 расположены соответственно в интронах 49 и 50 гена дистрофина. Эти полиморфизмы также обладают определенным количеством CA - повторов (24 и 16 соответственно), наследующихся по законам Менделя. Было обнаружено, что полиморфизм STR-49(-CA)24 находится в сильном неравновесии по сцеплению с STR-50 (AC)16, следовательно, и с микросателлитным полиморфизмом STR-45 (CA)28, что делает эти маркеры полезными, когда какой - то из этих маркеров не окажется информативным.

В определении уровня гетерозиготности этих полиморфизмов также исследовались 44 неродственных X-хромосом. В обоих случаях рассчитанная фактическая частота гетерозигот составила 45,5% (0,45; 10/22). Проведенный на основании полученных данных подсчет уровня теоретической гетерозиготности, т.е. информативность данных мультиаллельных систем, в наших исследованных выборках, по уравнению Харди-Вайнберга составил по – 0,35. Как видно, для обоих полиморфизмов теоретическое количество гетерозигот статистически не значимо снижено по сравнению с фактическим (0,35 и 0,45 соответственно $\chi^2=1,9$; $p=0,2$). Относительное отклонение фактической гетерозиготности от теоретической оказалось положительным и составило $D=+0,3$.

Гетерозиготность мультиаллельных локусов STR-45 (CA)28, STR-49 (CA) 24 и STR-50 (CA)16 является маркером выявления носителей и пренатальной ДНК - диагностики миопатий Дюшенна/Беккера в семьях вы-

сокого риска. Рассчитанный индекс суммарной теоретической гетерозиготности этих локусов составил 0,71. Это означает, что 71% женщин исследуемой выборки теоретически является информативным по одному из трех полиморфных маркеров для косвенной ДНК-диагностики. Однако при совместном исследовании трех мультиаллельных полиморфных маркеров, эффективность выявления гетерозиготного носительства гена среди женщин составила 83,3%, при этом различие между суммарной ожидаемой и наблюдаемой частотами гетерозигот оказалось статистически незначимым.

Выявлена положительная коррелятивная связь между носительством различных делеционных мутаций и гетерозиготным состоянием полиморфных локусов STR-45, STR-49 и STR-50. Гетерозиготный генотип STR-45 (CA)28 является высокоинформативным при выявлении гетерозиготных носительниц поврежденного гена дистрофина у родственниц больного ПМД/Б в Узбекистане.

При отсутствии частых делеций по результатам прямой и косвенной ДНК-диагностики поиск мутаций может осуществляться методом секвенирования гена дистрофина.

В ходе исследования секвенирование гена дистрофина было проведено 2 больным ПМД/Б, показанием для проведения секвенирования явилось наличие клинических симптомов и биохимических отклонений ПМД/Б, а также первично-мышечных поражений по результатам ЭМГ исследований. Секвенирование гена дистрофина

является методом подтверждающей диагностики ПМД-Д/Б при наличии клинико-лабораторных признаков заболевания и отрицательных результатах, полученных в ходе использования доступных методов прямой и косвенной ДНК-диагностики.

В результате секвенирования гена дистрофина в первом случае была обнаружена ранее описанная мутация - дупликация экзонов 3-7 в гене дистрофина в гемизиготном состоянии, приводящая к сдвигу «рамки считывания», что характерно для клинической формы заболевания ПМДД. Во втором случае выявлена ранее не описанная мутация C.4518+2T>A в гене дистрофина в гемизиготном состоянии, приводящая к заменам в участках доноров сайтов сплайсинга.

На базе Республиканского центра «Скрининг матери и ребёнка» была проведена пренатальная инвазивная диагностика ПМДД/Б 7 беременным женщинам, вынашивавшим плод мужского пола, из семей высокого риска по данной патологии. Из них в 2 случаях биоматериал плода для дальнейшего ДНК-исследования был получен методом амниоцентеза и в 5 случаях был проведен кордоцентез.

По результатам ДНК-диагностики в 3 случаях (42,8%) у плодов были идентифицированы делеции в гене дистрофина с высоким риском клинической реализации заболевания после рождения, семьям было рекомендовано прерывание беременности по медико-генетическим показаниям. В остальных семьях у плодов мутации гена дистрофина обнаружены не были, беременность была пролонгирована, и впоследствии было проведено постнатальное обследование детей с целью подтверждения отсутствия мутаций в гене дистрофина.

Выводы

1. Результаты молекулярно-генетических исследований показали, что в популяционной выборке Узбекистана преобладают семейные случаи ПМД Дюшенна/Беккера над мутацией de novo, а также протяженные делеции в 3'-конце гена дистрофина.

2. Делеции гена обнаружены в 64,6% обследованных хромосом, из них 21,9% расположены в проксимальной части гена, 78,1% - в дистальной, что соответствует данным по российской и казахской популяции.

3. Выявлена положительная коррелятивная связь между носительством различных делеционных мутаций и гетерозиготным состоянием полиморфных локусов STR-45, STR-49 и STR-50.

4. Гетерозиготный генотип STR-45 (CA)28 является высокоинформативным при выявлении гетерозиготных носительниц поврежденного гена дистрофина среди родственниц больного ПМДД/Б в Узбекистане.

5. При секвенировании гена дистрофина выявлена новая мутация C.4518+2T>A в гене DMD хромосомы X в гемизиготном состоянии, что указывает на необходимость проведения секвенирования ограниченного участка гена DMD для определения точковой мутации 32 экзона в гене дистрофина.

6. Проведение пренатальной диагностики в семьях высокого риска по ПМДД/Б позволило предупредить рождение больных детей и снизить инвалидизацию среди детей по данному заболеванию.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Арупова Д.Р. Распространенность и нозологический спектр нервно-мышечных заболеваний в различных популяциях (обзор литературы) // Наука, новые технологии и инновации. 2016. № 7. С. 72-75.
2. Иллариошкин С.Н., Иванова-Смоленская И.А., Маркова Е. Д. ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование в неврологии / Москва – Медицинское информационное агентство – 2002 г.
3. Basak J, Dasgupta UB, Banerjee TK, Senapati AK, Das SK, Mukherjee SC. Analysis of dystrophin gene deletions by multiplex PCR in eastern India. //Neurol India 2011; 54; 310-311.
4. Gatta V, Scarciolla O, Gaspari AR et al. Identification of deletions and duplications of the DMD gene in affected males and carrier females by multiple ligation probe amplification (MLPA). //Hum Genet 2015; 117; 92-98.
5. Zimowski JG, Massalska D, Holding M, et al. MLPA based detection of mutations in the dystrophin gene of 180 polish families with Duchenne/Becker muscular dystrophy. //Neurol Neurochir Pol 2017; 48: 416–422.

Поступила 16.05. 2019