

На правах рукописи

РАХМОНОВ РАХМАТУЛЛО АЗИЗОВИЧ

**НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ НЕРВНОЙ
СИСТЕМЫ В ТАДЖИКИСТАНЕ**

14.00.13 - НЕРВНЫЕ БОЛЕЗНИ

АВТОРЕФЕРАТ

ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

ДОКТОРА МЕДИЦИНСКИХ НАУК

Москва - 2004

Работа выполнена в Таджикском Государственном медицинском университете им. Абуали ибн Сино и Государственном учреждении Научно-исследовательском институте неврологии Российской академии медицинских наук

Научные консультанты:

доктор медицинских наук, профессор С. Н. Иллариошкин

доктор медицинских наук, профессор И. А. Иванова-Смоленская

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор И. А. Завалишин

доктор медицинских наук, профессор М. А. Лобов

доктор медицинских наук Е. Л. Дадали

Ведущая организация - Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова.

Защита состоится «2» марта 2004 г. в 12.00 часов на заседании диссертационного совета Д 001.006.01 при Государственном учреждении Научно-исследовательском институте неврологии Российской академии медицинских наук по адресу: 125367, Москва, Волоколамское шоссе, 80.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГУ НИИ неврологии РАМН.

Автореферат разослан «2» февраля 2004 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

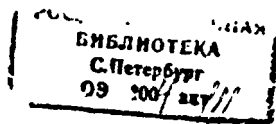
С. Н. Иллариошкин

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Наследственные болезни нервной системы составляют существенную часть (2-5%) всей неврологической патологии в современном обществе [Davis M.V. et al., 1993]. Чаще всего данные заболевания поражают лиц молодого возраста и в большинстве случаев характеризуются неуклонно прогрессирующим течением и тяжелой инвалидизацией, что определяет высокую медицинскую и социальную значимость изучаемой проблемы [Иванова-Смоленская И.А. и др., 1998; Bird T.D., Bennett R.L., 1995; Harding A.E., 1993].

Достигнутый в последние годы прогресс в области новейших молекулярно-генетических технологий затронул практически все стороны клинической нейрогенетики, позволив поднять на качественно новый уровень медико-генетическое консультирование при наследственных болезнях нервной системы, разработать концепцию их генетической гетерогенности и создать генетическую классификацию данных форм патологии [Иллариошкин С.Н. и др., 2002; Rosenberg R.N., 1995; Stevanin G. et al., 2000]. Использование современных методов ДНК-анализа позволяет устанавливать точную генетическую структуру наследственных заболеваний в исследуемых популяциях, что имеет большое значение для организации здравоохранения и планирования необходимого объема медико-генетической помощи населению конкретных регионов.

Одной из наиболее актуальных задач клинической генетики (в том числе применительно к неврологии) в настоящее время является сравнительный анализ различных популяций мира с точки зрения распространенности и особенностей спектра наследственных моногенных заболеваний центральной и периферической



нервной системы, частоты и молекулярных характеристик мутаций в соответствующих генах, а также установления «удельного веса» и вклада тех или иных хромосомных локусов в формирование генетического разнообразия и гетерогенности отдельных форм наследственной патологии [Доклад научной группы ВОЗ, 1997; Evans G.A., 1998]. В исследованиях такого рода особую ценность имеет изучение популяций, характеризующихся рядом уникальных демографических и генетических параметров, в частности - высокой рождаемостью и разветвленной структурой семей с большим количеством детей, четким делением на сравнительно однородные этнические группы, высоким уровнем инбридинга и т.д., что предоставляет возможность использования весьма информативных методов молекулярно-генетического анализа (гомозиготность по происхождению, анализ генетического сцепления в единых репрезентативных семьях и др.) [Davis M.B. et al., 1993; Ott J., 1991]. Ряд имеющихся в литературе работ, выполненных на примере таких популяций в России (Дагестан и др.), СНГ и других странах мира (Туркменистан, Тунис, Израиль и т.д.) показал высокую ценность указанных подходов в установлении важнейших популяционно-генетических закономерностей и картировании локусов наследственных неврологических заболеваний [Багыева Г.Х., 1999; Иллариошкин С.Н. и др., 1997; Руденская Г.Е., 1998; Ben Hamida C. et al., 1993; Hillaire D. et al., 1994].

Одной из таких популяций, обладающих чрезвычайно высокой потенциальной информативностью для медицинской генетики, является популяция Республики Таджикистан, характеризующаяся расширенным воспроизводством населения, тенденцией к однонациональным бракам, преобладанием сельского населения, живущего преимущественно в горной местности (93% территории

республики составляют горы), высоким уровнем инбридинга и включающая 6 млн. 250 тыс. населения. Между тем, до настоящего времени в литературе имелись лишь единичные работы [Победимская Т.Д., 1981; Пулатов А.М., 1989; Пулатов А.М. и др., 1990], касавшиеся отдельных частных аспектов нейрогенеритарной патологии в Таджикистане и относящиеся к «догеномной» эре медицинской генетики. Настоящая работа представляет собой первое комплексное исследование такого рода, охватывающее всю территорию Таджикистана и проведенное с использованием общепринятых эпидемиологических подходов и технологий ДНК-анализа.

Таким образом, ЦЕЛЮ настоящего исследования явился комплексный клинический, популяционный и молекулярно-генетический анализ, а также разработка системы медико-генетического консультирования ряда наиболее распространенных наследственных заболеваний нервной системы в таджикской популяции.

ЗАДАЧИ исследования:

1. Изучение распространенности основных форм прогрессирующих мышечных дистрофий (форма Дюшенна, конечностно-поясная форма) на территории Таджикистана.
2. Анализ общего груза наследственных заболеваний нервной системы в ряде регионов республики, ранее не исследованных с генетико-эпидемиологической точки зрения (Кулябская область, различные районы Курган-Тюбинской области на юге республики), анализ фенотипических проявлений наследственной неврологической патологии в Таджикистане.
3. Изучение особенностей клинической картины и характера прогрессирования миодистрофии Дюшенна в таджикских семьях.
4. Проведение мутационного скрининга (поиск протяженных делений) гена

дистрофина в обследованных случаях прогрессирующей мышечной дистрофии Дюшенна, анализ спектра мутаций и клинико-генетических корреляций, получение опыта прямой ДНК-диагностики данного заболевания в таджикской популяции.

5. Изучение клинико-генетических особенностей эссенциального тремора, выявленного в группе семей из горного изолята Исфаринского района Республики Таджикистан.
6. Анализ генетического сцепления и оценка хромосомной локализации мутантного гена (генов) в обследованных семейных случаях эссенциального тремора.
7. Разработка системы медико-генетического консультирования и профилактики изученных наследственных заболеваний нервной системы в таджикской популяции.

Научная новизна. Впервые на территории Республики Таджикистан проведен комплексный клинико-генетический, популяционно-эпидемиологический и молекулярно-генетический анализ основных групп наследственных заболеваний нервной системы.

Установлена распространенность наследственных болезней нервной системы в различных регионах Таджикистана. Показано преобладание аутосомно-рецессивных заболеваний в структуре груза наследственной неврологической патологии в таджикской популяции, а также региональное накопление определенных форм патологии. Впервые описан ряд редких фенотипов и сочетанных форм наследственных заболеваний нервной системы, наблюдавшихся нами в таджикской популяции. Охарактеризованы фенотипические особенности ПМД Дюшенна в таджикской популяции - тенденция к раннему развитию контрактур в крупных суставах, частое сочетание двигательных симптомов с

умственного отсталостью и др. Установлен характер делеционного повреждения гене дистрофина у больных ПМД Дюшенна в Таджикистане: показана высокая частота выявляемости делеций при рутинном мутационном скрининге (мультиплексная ПЦР), их преимущественная локализация в области экзонов 44-60 и отсутствие «горячей точки» делеций в проксимальной части гена.

В таджикской популяции выявлена форма аутосомно-доминантного эссенциального тремора, сцепленная с хромосомой 3q13 (локус *ETM1*). Проведено тонкое генетическое картирование, ограничившее изучаемый локус до участка размером 2 сМ, внешними границами которого являются маркеры D3S3620 и D3S3720. Расширены представления о генетической гетерогенности эссенциального тремора и обосновано положение о существовании дополнительного локуса данного заболевания, отличного от картированных ранее хромосомных локусов *ETM1* и *ETM2*.

Практическая значимость. На основании полученных данных о генетической эпидемиологии наследственных болезней нервной системы в Таджикистане сформулированы конкретные рекомендации, направленные на развитие в «ключевых» регионах служб медико-генетического консультирования и совершенствование организации системы здравоохранения республики. Расширены представления о спектре фенотипических проявлений различных форм прогрессирующих мышечных дистрофий. Разработан алгоритм молекулярной диагностики ПМД Дюшенна у больных в таджикской популяции на основе комбинированных методов мутационного скрининга гена дистрофина. Получен первый в стране опыт прямой и косвенной ДНК-диагностики некоторых форм наследственных заболеваний нервной системы, предложена модель для оказания медико-генетической помощи населению Таджикистана (в том числе с

использованием методов ДНК-анализа), что определило существенную профилактическую направленность проведенного исследования.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Популяционная распространенность прогрессирующих мышечных дистрофий в Таджикистане (5,6 на 100 000 для формы Дюшенна и 2,7 на 100 000 для конечностно-поясная формы) соответствует аналогичным показателям в других изученных популяциях мира.
2. Для различных регионов Таджикистана характерна варибельность показателей распространенности основных групп наследственных болезней нервной системы - от 11,6 на 100 000 населения в Кулябской области до 59,0-75,6 на 100 000 Курган-Тюбинской области, а также накопление случаев наследственной патологии в отдельных субпопуляциях. Указанные особенности в значительной степени обусловлены действием неблагоприятных регион-специфичных факторов мутагенеза, связанных, в частности, со сложившимся характером агрохимического производства.
3. В структуре груза наследственной неврологической патологии в Таджикистане преобладают заболевания с аутосомно-рецессивным типом наследования (свыше 65-70% всех обследованных семей). Отмечается относительно высокая встречаемость редких фенотипов и сочетанных форм наследственной патологии, ряд из которых (осложненная форма аутосомно-рецессивного блефароспазма, конечностно-поясная ПМД с синдромом Жильбера, ПМД Дюшенна с диффузной ладонно-подошвенной

кератодермией конечностей и др.) описаны нами впервые.

4. ПМД Дюшенна в таджикской популяции по сравнению с «классическими» описаниями болезни характеризуется рядом фенотипических и молекулярно-генетических особенностей. К первым относятся раннее развитие контрактур в крупных суставах, частая ассоциация болезни с умственной отсталостью и дизрафическими стигмами, ко вторым - высокая выявляемость делеций в гене дистрофина при рутинном мутационном скрининге (52% всех обследованных семей) и их преимущественная локализация в дистальной части гена.
5. В группе таджикских семей с аутосомно-доминантным эссенциальным тремором установлена генетическая форма данного заболевания и его локус (*ETM1*) на хромосоме 3q13; в результате тонкого генетического картирования установлены внешние границы *ETM1-нокуса* - маркеры D3S3620 и D3S3720 (генетическое расстояние 2 сМ). Показаны дальнейшая генетическая гетерогенность и существование еще одного хромосомного локуса аутосомно-доминантного эссенциального тремора.
6. Получен первый в Таджикистане опыт прямой и косвенной ДНК-диагностики некоторых форм наследственных заболеваний нервной системы. Предложена модель для оказания медико-генетической помощи населению Таджикистана, в том числе с использованием комбинированных методов ДНК-анализа.

Апробация работы. Работа апробирована и рекомендована к защите на совместном заседании научных сотрудников III сосудистого, нейрогенетического,

нейроинфекционных отделений, отделения реанимации и интенсивной терапии, лаборатории биохимии и лаборатории клинической электрофизиологии ГУ НИИ неврологии РАМН 13.10.2003 г. Материалы диссертации были представлены на 2-й итоговой конференции НИИ медицинской генетики ТНЦ РАМН (Томск, 1992), 42-й научной конференции Госмедуниверситета им. Абуали ибн Сино «Актуальные вопросы профилактики болезней человека» (Душанбе, 1994), Российском Конгрессе «Новые технологии в неврологии и нейрохирургии на рубеже тысячелетий» (Ступино, 1999), Международном Конгрессе по болезни Паркинсона и расстройствам движений (Барселона, 2000), II (VI) Российском съезде медицинских генетиков (Курск, 2000), VIII Всероссийском съезде неврологов (Казань, 2001), Республиканской научно-практической конференции к 10-летию независимости Республики Таджикистан- (Душанбе, 2001), Третьей международной научно-практической конференции «Здоровье и образование в XXI веке» (Москва, 2002).

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 24 научные работы, включая 1 монографию и 2 практических руководства.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 205 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания общей характеристики обследованных больных и методов исследования, результатов, обсуждения, выводов, библиографического указателя (включающего 259 источников, в том числе 80 работ отечественных и 179 зарубежных авторов) и приложения. Работа иллюстрирована 20 рисунками и 14 таблицами.

Автор выражает искреннюю благодарность за помощь в проведении молекулярно-генетического раздела работы старшему научному сотруднику лаборатории молекулярной генетики НИИ медицинской генетики Томского научного центра РАН, кандидату биологических наук О.Н.Одиноквой, старшему научному сотруднику нейрогенетического отделения ГУ НИИ неврологии РАН, кандидату медицинских наук С.А.Клюшникову и сотрудникам молекулярной лаборатории Отдела патологии нейронов Национального Института здоровья и медицинских исследований Франции - INSERM U289 (руководитель лаборатории - проф. A.Vrice). Автор выражает также признательность коллективу кафедры нервных болезней и основ медицинской генетики Таджикского Государственного медицинского университета им. Абуали ибн Сино (зав. кафедрой - проф. М.Н.Нажмутдинова) и коллективу кафедры нервных болезней Таджикского института последипломной подготовки медицинских кадров (зав. кафедрой - проф. Ш.Ф.Раджабалиев) за помощь в выполнении популяционно-генетической части настоящего исследования. Автор благодарен сотрудникам Министерства здравоохранения Республики Таджикистан за помощь в организации экспедиционных исследований.

2. ОБЪЕМ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Общая характеристика больных и обследованных семей. В совокупности нами было обследовано 466 больных из 351 семьи с различными моногенными наследственными заболеваниями нервной системы. Распределение больных по нозологическим формам и общий объем исследования представлены в таблице 1.

Большинство больных (403 пациентов из 318 семей) обследованы

Таблица 1. Общий объем проведенного исследования.

Заболевание	Общее число обследованных больных	Число семей	Число исследованных образцов ДНК (включая лиц из групп риска)
<i>Эссенциальный тремор</i>	39	22	60
<i>ПМД Дюшенна</i>	174	135	59
<i>Другие формы ПМД (конечностно-поясная, Ландузи-Дежерина и др.)</i>	168	157	-
<i>Спинальная амиотрофия</i>	8	5	-
<i>Невральная амиотрофия Шарко-Мари-Тус</i>	7	6	-
<i>Атаксия Фридрейха</i>	13	3	-
<i>Другие формы наследственных атаксий</i>	6	3	-
<i>Наследственные спастические параличи</i>	22	9	-
<i>Наследственные дистонические синдромы</i>	9	3	-
<i>Другие формы наследственных экстрапирамидных болезней</i>	8	5	-
<i>Наследственные формы эпилепсии</i>	12	3	-
ВСЕГО	466	351	119

амбулаторно в процессе повторных экспедиций в различные регионы Таджикистана, организованных и проведенных нами в 1993-2000 гг. совместно с

сотрудниками кафедры нервных болезней Таджикского Государственного медицинского университета им. Абуали ибн Сино, специалистами нейрогенетического отделения НИИ неврологии РАМН и врачами лечебно-профилактических учреждений и местных органов здравоохранения республики Таджикистан.

63 больных и членов их семей обследованы стационарно в нейрогенетическом отделении НИИ неврологии РАМН (Москва) и неврологическом отделении Республиканской клинической больницы Таджикистана (Душанбе). Для части больных из обследованных семей с различными формами наследственных заболеваний нервной системы нами были получены из других лечебных учреждений страны и проанализированы подробные выписки из историй болезни.

В • обследованных семьях с эссенциальным тремором с целью выбора консервативной модели при анализе генетического сцепления нами использовались предложенные в литературе стандартные критерии «достоверного» и «вероятного» диагноза данного заболевания [Higgins J.J. et al, 1997; Brin M.F., Koller W., 1998]; при этом анализ сцепления и расчет Лод-баллов проводился в строго отобранной выборке «достоверных» случаев эссенциального тремора. Обследование больных проводилось по унифицированному протоколу, включавшему: а) стандартизированное неврологическое обследование с фиксированным набором клинических тестов, специфических для выявления тремора «эссенциального» типа [Иванова-Смоленская И.А., 1986]; б) анализ «спирали Архимеда» и других стандартных графических проб; в) видеосъемку больных, позволяющую проводить ретроспективный анализ клинического статуса обследованных пациентов *ex consilio*.

При генетико-эпидемиологическом анализе наследственных болезней

нервной системы использован *обзорный подход*, включавший в себя: а) регистрацию больных и семей; б) дальнейшее клинико-генетическое и лабораторно-инструментальное обследование с уточнением диагноза. На первом этапе основным источником информации о наличии семей с наследственными болезнями нервной системы служили специализированные неврологические стационары - районные, областные, городские и республиканские. При изучении ПМД Дюшенна нами был также использован регистр, составленный на кафедре нервных болезней Таджикского Государственного медицинского университета им. Абуали ибн Сино доцентом Ш.Ф.Раджабалиевым. При сборе первичной информации использованы специальные анкеты, заполняемые персоналом фельдшерско-акушерских и пунктов, сельских врачебных амбулаторий, центральных районных больниц и поликлиник. Используются также разнообразные дополнительные источники информации: картотеки межрайонных ВТЭК, документы статистических кабинетов, данные годовых отчетов и архивов больниц и, других лечебных учреждений республики.

Последующие этапы работы включали сбор анкет, первичное клинико-генеалогическое изучение семей с наследственными заболеваниями нервной системы, их детальное клиническое обследование врачами-специалистами и верификация диагноза с использованием дополнительных лабораторно-инструментальных методов обследования. Дополнительное популяционно-генетическое обследование включало изучение половозрастной структуры, миграционной картины, характера браков и инбридинга в обследованных популяциях. Необходимые данные получали при подворных обходах и анализе документации поселковых администраций.

Молекулярно-генетические методы исследования. Молекулярно-

генетическая часть работы выполнялась на базе ДНК-лаборатории нейрогенетического отделения НИИ неврологии РАМН, НИИ медицинской генетики Томского научного центра РАМН и молекулярной лаборатории Отдела патологии нейронов Национального Института здоровья и медицинских исследований - INSERM U289 (Париж, Франция). В совокупности исследовано 119 образцов ДНК, в том числе 55 образцов ДНК больных с различными наследственными моногенными заболеваниями нервной системы и 64 образца ДНК клинически здоровых родственников из обследуемых семей (включая лиц из группы риска) - см. таблицу 1.

В работе использован комплекс базовых молекулярно-генетических методов исследования: полимеразная цепная реакция (ПЦР) моно- и мультипраймерного типа; рестрикционный анализ; различные методики электрофореза в агарозном и полиакриламидном гелях, включая разделение продуктов амплификации с использованием автоматической лазерно-флуоресцентной секвенирующей техники.

Скрининг наиболее частых делеций в гене дистрофина проводился посредством мультиплексной ПЦР с использованием набора праймеров, предложенных Chamberlain J.S. et al. (1988), Roberts R.G. et al. (1989) и Beggs A.H. et al. (1990) и позволяющих одновременно амплифицировать часть промоторной области гена дистрофина и экзоны 3,6, 8,13,17,19,43,44,45,48, 50,52 и 60. После проведения ПЦР анализ продуктов мультиплексной реакции проводился в 1,5% агарозном или 6% полиакриламидном гелях, с окраской ДНК бромистым этидием и визуализацией экзонов в ультрафиолетовом свете.

Для проведения косвенной ДНК-диагностики ПМДД исследовался полиморфизм по двум локусам системы pERT гена дистрофина в хромосомной области Xp21: локус 87-8/TaqI и 87-15/Bam HI на основе различий длин рестрикционных фрагментов - ПДРФ [Neimann-Seyde S. et al., 1992]; (использовались эндонуклеазы фирмы «Ферментас», Литва). Анализ продуктов рестрикции осуществляли в 1% агарозном или 6% полиакриламидном геле, с последующей визуализацией ДНК в бромистом этидии и ультрафиолетовом свете.

Диагностика носительства делеции 946-948delGAG в 5-м экзоне гена *DYT1*, ответственной за развитие основного генетического варианта дофаночувствительной дистонии, осуществлялась на основе ПЦР со стандартной парой праймеров DYT-F и DYT-R [Ozelius L.J. et al., 1997]. Определение делеции проводилось с помощью стандартного BseRI-рестрикционного анализа, либо путем прямого электрофоретического разделения продуктов амплификации в 4% высокоразрешающей агарозе MS ("Boehringer Mannheim").

Гипервариабельные микросателлитные маркеры амплифицировались с помощью ПЦР на приборе фирмы "MJ Research" в стандартном режиме амплификации. В ряде случаев использовалась мультиплексная (мультипраймерная) амплификация нескольких маркеров, различающихся по своей длине и меченных различными флюорохромами. Продукты амплификации разделялись в 5%-ном денатурирующем полиакриламидном геле с использованием автоматического секвенатора ABI Prism 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems); результаты электрофореза анализировались с помощью пакета программ GeneScan Analysis Software (Applied Biosystems).

Анализ генетического сцепления и методы статистической обработки

результатов исследования. Расчет парных Лод-баллов в семьях с эссенциальным тремором осуществлялся с помощью программы MLINK стандартного пакета программ FASTLINK (версия 2.2). При расчете генетического сцепления использовалась общепринятая модель аутосомно-доминантного наследования, возраст-зависимой пенетрантности (с введением 4 классов предрасположенности на основе анализа кривой кумулятивного возраста начала болезни), частоты мутантного аллеля и фенкопий, соответственно, 0.005 и 0.01, а также равной частоты маркерных аллелей. В процессе анализа дополнительно производились повторные расчеты Лод-баллов с использованием альтернативных моделей с переменными частотами мутантного аллеля (0.01-0.02) и фенкопий (0.001-0.03).

Анализ мультилокусного сцепления производился с использованием программы LINKMAP [Lathrop G.M. et al., 1984] и опубликованных данных об относительных генетических дистанциях между исследуемыми локусами [*GDB Online*]. Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием компьютерной программы Microsoft Excel 8.0 (расчет средних величин, достоверность различий средних и относительных величин, показатель соответствия χ^2).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Груз наследственных болезней нервной системы в Таджикистане

Детальный анализ общего генетического груза наследственных болезней нервной системы был проведен нами в ряде не исследованных ранее регионов Таджикистана - в Кулябской области и на юге республики (Куйбышевский и Колхозабадский районы Курган-Тюбинской области) (рис. 1).

Общий спектр наследственных заболеваний нервной системы в обследованных регионах республики представлен в таблице 2. Как видно из данной таблицы, основное «ядро» общего спектра наследственной неврологической патологии составляют 10-11 форм наследственных болезней нервной системы, самыми частыми из которых оказались прогрессирующие мышечные дистрофии различных типов, аутосомно-рецессивная спинальная амиотрофия, аутосомно-рецессивные наследственные спастические параплегии. Более редкие случаи относились к наследственным невропатиям, а также к формам с преимущественным поражением экстрапирамидной, пирамидной и мозжечковой систем.

В Кулябской области (668 тыс. чел.) обзорным методом обследованы 8 районов. Суммарно зарегистрировано 69 больных из 50 семей, в том числе 31 семья с аутосомно-рецессивными формами и 19 семей с X-сцепленными рецессивными формами (рис.2). Спектр выявленных наследственных неврологических заболеваний был представлен 8 нозологическими формами (см. таблицу 2).

В Курган-Тюбинской области Таджикистана нами детально обследованы Куйбышевский район (68,2 тыс. км², население 81,8 тыс. человек) и Колхозабадский район (11 тыс. км², население 101,7 тыс. человек).

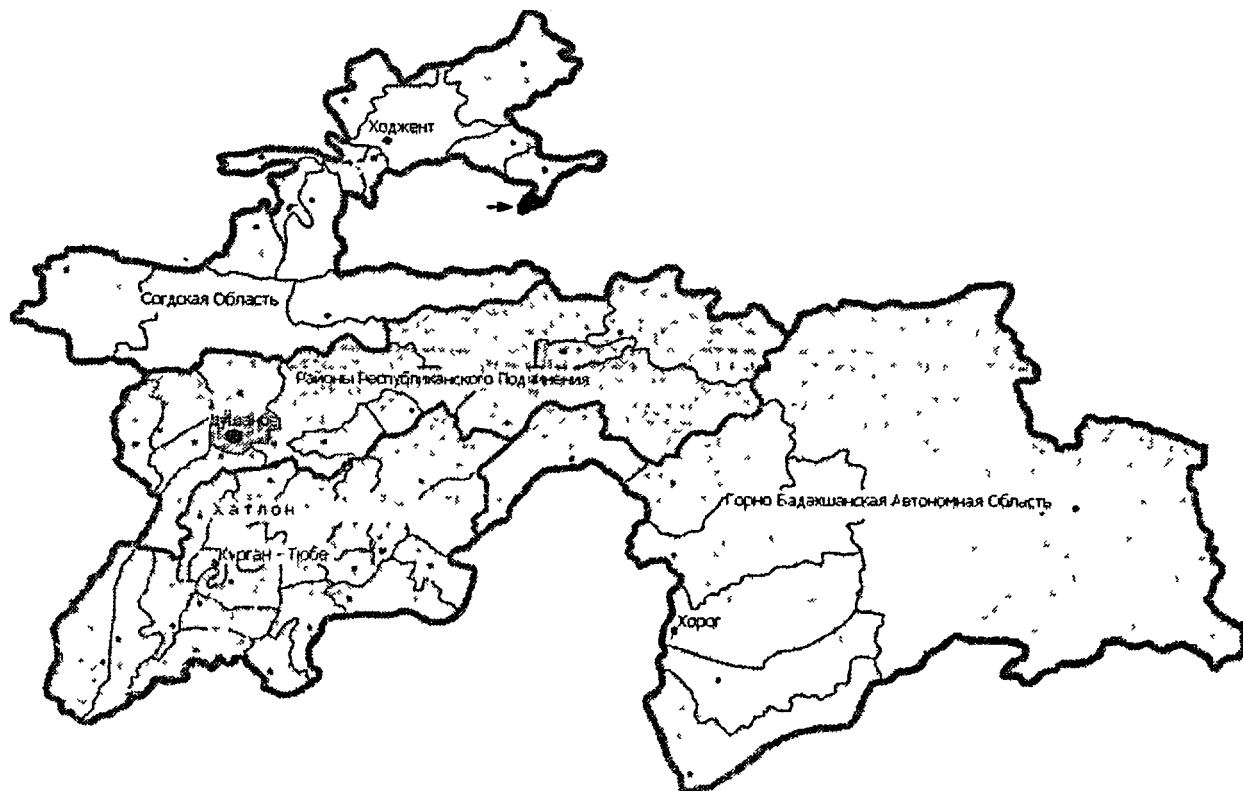


Рисунок 1. Карта Таджикистана
Стрелкой указан изолят в Исфаринском районе, в котором были выявлены и обследованы семейные случаи эссенциального тремора.

Таблица 2. Генетическая эпидемиология наследственных болезней нервной системы в Кулябской и Курган-Тюбинской областях Таджикистана.

Наследственные нозологические формы	Обследованные популяции		
	Кулябская область (8 районов)	Курган-Тюбинская область (Куйбышевский район)	Курган-Тюбинская область (Колхозабадский район)
	число больных / число семей	число больных / число семей	число больных / число семей
ПМДД	24 / 19	10 / 5	8 / 3
КПМД (АР)	26 / 22	10 / 10	26 / 15
ПМД Ландузи–Дежерина	–	–	1 / 1
Недифференцированные формы миопатий (АР)	–	1 / 1	–
Спинальная амиотрофия (I–III типы)	6 / 3	–	2 / 2
Наследственная невропатия Шарко–Мари (АР+АД)	1 / 1	4 / 3	2 / 2
Наследственная спастическая паралепгия (АР + АД)	–	10 / 4	12 / 5
Атаксия Фридрейха	2 / 1	6 / 1	5 / 1
Спиноцеребеллярные атаксии (АД)	–	2 / 1	2 / 1
Синдром Маринеску–Шегрена	2 / 1	–	–
Болезнь Паркинсона (АД)	–	3 / 1	–
Болезнь Вильсона–Коновалова	1 / 1	–	–
Осложненная форма блефароспазма (АР)	7 / 2	–	–
Наследственная эпилепсия (АД)	–	12 / 3	–
Наследственная дистония (АД)	–	2 / 1	–

Примечание: АД – аутосомно-доминантный; АР – аутосомно-рецессивный.

Суммарно на территории Куйбышевского района нами выявлены 60 больных из 30 семей с наследственными болезнями нервной системы, в том числе 7 семей с аутосомно-доминантными формами, 18 семей с аутосомно-рецессивными формами и 5 семей с X-сцепленными рецессивными формами (рис. 2). Общий спектр заболеваний был представлен 10 нозологическими формами (таблица 2). Характерной особенностью распределения семей с наследственными болезнями нервной системы на территории Куйбышевского района была его неравномерность, с заметным накоплением случаев заболеваний в отдельных субпопуляциях (например, на территории отдельных совхозов).

В Колхозабадском районе нами выявлены 58 больных из 30 семей, из них: 5 семей с аутосомно-доминантными формами, 22 семьи с аутосомно-рецессивными формами и 3 семьи с X-сцепленным рецессивным заболеванием (рис. 2). Общий спектр заболеваний был представлен 9 нозологическими формами (см. таблицу 2). Как и в Куйбышевском районе, на территории Колхозабадского района нами была выявлена неравномерность распределения больных по территории региона, однако имеющееся накопление случаев касалось в основном лишь отдельных нозологических форм.

Таким образом, исходя из общей численности населения обследованных областей Таджикистана, распространенность основных групп наследственных заболеваний нервной системы оказалась чрезвычайно вариабельной. В Кулябской области она составила 10,4 на 100 000, что соответствует среднепопуляционным данным по различным регионам России, СНГ и стран дальнего зарубежья [Магалов Ш.И., 1986; Руденская Г.Е., 1998; Садеков А.И., 1991; Emery A.E.H., 1991; Kurtzke J., 1982]. В то же время, в Куйбышевском и Колхозабадском районах Курган-

Тюбинской области распространённость наследственной неврологической патологии оказалась значительно выше - 73,3 на 100 000 населения и 57,0 на 100 000 населения, соответственно. По нашему мнению, такие высокие значения могут быть связаны с действием определенных неблагоприятных регион-специфичных факторов мутагенеза - в первую очередь, с традицией агрессивного неконтролируемого агрохимического производства (хлопкосеяние), сложившегося в силу ряда исторических и социально-экономических условий на территории Курган-Тюбинской области Таджикистана.

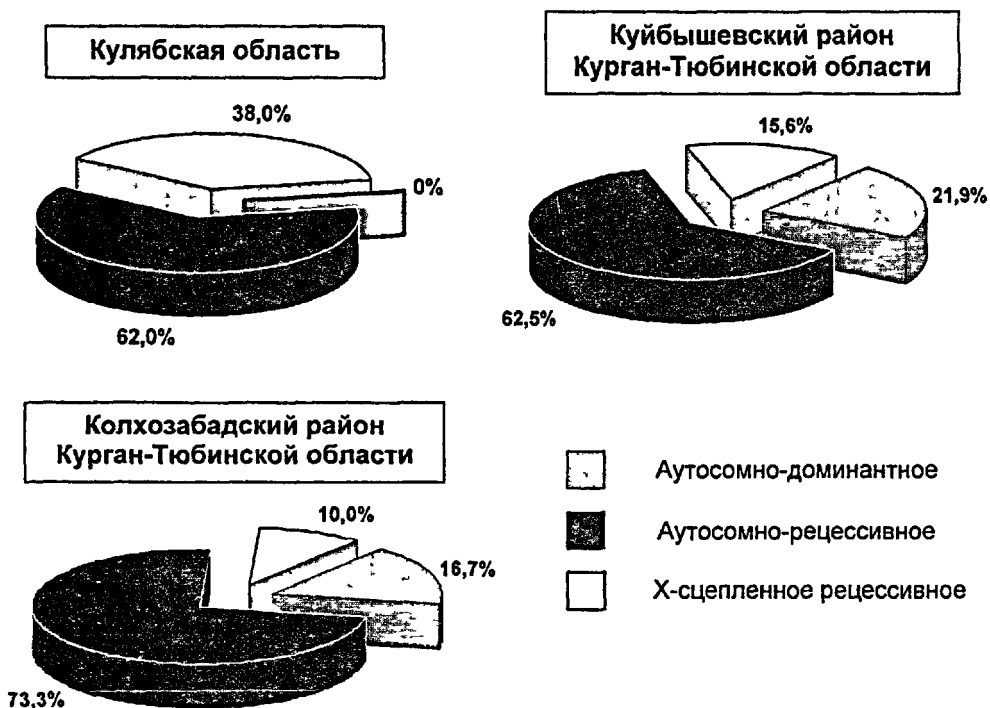


Рисунок 2. Соотношение заболеваний с разными типами наследования в изученных регионах Таджикистана (% семей).

Как видно на рис. 2, общей закономерностью для всех изученных регионов Таджикистана явилось заметное преобладание в структуре груза наследственной неврологической патологии заболеваний с аутосомно-рецессивным типом наследования (62-73,3% семей). Это соответствует результатам Г.Х.Багыевой (1999), ТДПобедимской (1981), Г.Е.Руденской (1996; 1998), Г.Е.Руденской и ЕДМарковой (1986), Ф.К.Ханнановой (1986), полученным при изучении других популяций Средней Азии (Туркмения, Узбекистан, восточный Таджикистан). Сходным в рассматриваемых популяциях оказался и общий нозологический спектр выявленных наследственных заболеваний нервной системы. Можно предположить, что в Таджикистане, как и в близких ему по своим характеристикам популяциях, значительный удельный вес аутосомно-рецессивных заболеваний связан с высоким уровнем случайного инбридинга и генеалогической брачной ассортативностью.

В соответствии с известной закономерностью накопления редких аутосомно-рецессивных болезней в инбредных популяциях и формированием в связи с этим выраженного своеобразия спектра имеющегося груза наследственной патологии [Зинченко Р.А., 2001], нами в таджикской популяции наблюдался ряд уникальных фенотипов с аутосомно-рецессивным типом наследования. К ним относится, в частности, осложненная форма блефароспазма («блефароспазм плюс»), наблюдавшаяся у 7 sibсов из 2 инбредных семей и не описанная ранее в литературе [McKusick V.A. - OMIM]. Другие редкие наблюдения необычных фенотипов и клинико-генетических феноменов, сделанные нами в различных субпопуляциях Таджикистана, включали сочетание КПМД с синдромом Жильбера, сочетание аутосомно-доминантного паркинсонизма с эписиндромом, а также наличие в пределах одной семьи независимой сегрегации двух форм аутосомно-рецессивных

заболеваний - наследственной спастической параплегии и КПМД.

Самостоятельным разделом настоящего исследования стал впервые проведенный нами на всей территории Таджикистана генетико-эпидемиологический анализ распространенности основных, наиболее тяжелых форм прогрессирующих мышечных дистрофий - ПМД Дюшенна и конечностно-поясной формы ПМД. Анализ проводился обзорным методом, включавшим первичную регистрацию больных и семей с использованием республиканских регистров, анкетирования и первичной медицинской документации, а также последующую верификацию диагноза при личном осмотре и лабораторно-инструментальном обследовании.

Распределение выявленных случаев мышечных дистрофий по регионам-республики представлено в таблице 3.

Согласно полученным данным, общая распространенность мышечных дистрофий в Таджикистане составляет: ПМДД - 5,6 случаев на 100 000 (из расчета на мужскую часть населения Таджикистана), КПМД — 2,7 на 100 000 населения. При этом отмечен ряд особенностей генетической эпидемиологии данных форм ПМД в таджикской популяции: а) относительная равномерность распределения случаев ПМД в республике; б) заметное преобладание спорадических случаев заболевания (это касается как КПМД, так и, в меньшей степени, ПМДД); в) отсутствие выявленных случаев КПМД с аутосомно-доминантным типом наследования; г) явное преобладание среди заболевших лиц представителей коренной национальности — таджиков.

Полученные цифры распространенности указанных форм ПМД в Таджикистане в целом соответствуют аналогичным данным в абсолютном большинстве изученных популяций мира, укладываясь в разброс средних значений

от 2,6 до 10,9 на 100 000 для ПМДД и от 1,9 до 4,4 на 100 000 для аутосомно-рецессивных КПМД [Becker P.E., 1980; Emeiy A.E.H., 1991; Lang H. et al., 1989; Radhakrishnan K. et al, 1987; van Essen A.J., ten Kate L.P., 1984; Zidar J., 1991]. Проведенное нами в Таджикистане исследование позволяет заполнить существенный пробел в «генетической карте» мира в отношении данной наиболее распространенной группы наследственной нервно-мышечной патологии.

Таблица 3. Генетическая эпидемиология ПМД Дюшенна и конечностно-поясной ПМД в Таджикистане.

Область Таджикистана	ПМД Дюшенна		Конечностно- поясная ПМД	
	Число больных	Число семей	Число больных	Число семей
Бадахшанская автономная область	8	5	2	1
Кулябская область	24	19	26	22
Курган-Тюбинская область	38	29	38	37
Сугдская область	23	18	23	23
г. Душанбе	31	22	36	34
Районы и города республиканского подчинения	50	42	41	38
ВСЕГО	174	135	166	155

3.2. Клинико-генетический анализ прогрессирующей мышечной дистрофии Дюшенна в Таджикистане

В таджикской популяции нами впервые был проведен детальный клинико-генетический анализ ПМД Дюшенна (ПМДД) - наиболее частой и тяжелой формы прогрессирующих мышечных дистрофий. Суммарно обследованы 174 больных ПМДД из 135 семей, включая 71 семейный и 103 спорадических случая болезни. Среди родительских пар в 66% семей имел место моноэтнический брак между таджиками, в 14% - между узбеками, в 9% - между супругами других национальностей (русские, татары, казахи, киргизы, туркмены), 11% семей составили смешанные браки (таджики и узбеки).

Общая клиническая характеристика ПМДД в наблюдавшихся таджикских семьях представлена в таблице 4. В целом клиническая картина заболевания у обследованных нами больных (характер фенотипа, возраст начала болезни, темп прогрессирования) укладывалась в рамки классических описаний ПМДД [Давиденков С.Н., 1934; Бадалян Л.О. и др., 1971; 1988; Темин П.А. и др., 1997; 1998; Емегу А.Е.Н., 1993; 1998; Specht L.A., Kunkel L.M., 1993]. Наряду с этим нами был выявлен ряд особенностей симптоматики и течения заболевания ПМДД, характерных для таджикской популяции.

Во-первых, у пациентов отмечено сравнительно раннее присоединение и быстрое прогрессирование контрактур в голеностопных и коленных суставах. Как видно из таб. 4, такие контрактуры суммарно выявлялись у 87,8% и 55,2% всех больных, соответственно. Более того, при раннем начале болезни они были еще более частыми: так, в случаях манифестации болезни в первые годы жизни

Таблица 4. Частота встречаемости отдельных симптомов ПМДД.

№№	Признаки заболевания	Частота симптомов (%)
1.	Начало заболевания:	
	▪ на первом году;	15,5
	▪ в 3–4 года;	35,1
	▪ в 6–7 лет	48,3
2.	Отставание в физическом развитии:	
	▪ (удерживает голову в 6–7 мес. и позже, сидит в 11–12 мес., стоит в 1,5 года, ходит в 2 года);	25,3
	▪ начало ходьбы к 3 годам и позже	73,0
3.	Нарушение передвижения:	
	▪ «утиная» походка;	100
	▪ «лестницеобразное» вставание;	43,1
	▪ невозможность самостоятельно вставать;	37,4
	▪ невозможность самостоятельно сесть	24,1
4.	Деформация скелета:	
	▪ лордоз в поясничном отделе;	96,0
	▪ деформация грудной клетки;	44,3
	▪ деформация стоп	81,6
5.	Контрактуры:	
	▪ в голеностопных суставах;	87,8
	▪ в коленных суставах	55,2
6.	Гипотрофия и слабость проксимальной мускулатуры рук	86,2
7.	Гипотрофия и слабость проксимальной мускулатуры ног	62,6
8.	Атрофия и слабость мышц тазового пояса	97,1
9.	Диффузная атрофия и слабость всех скелетных мышц	9,2
10.	Псевдогипертрофия мышц:	
	▪ икроножных;	86,2
	▪ дельтовидных;	7,5
	▪ ягодичных	27,0
11.	Отсутствие рефлексов:	
	▪ локтевых;	23,6
	▪ коленных;	69,0
	▪ ахилловых	88,5
12.	Стигмы и дизрафические изменения	67,2
13.	Вегетативно-сосудистые нарушения	34,5
14.	Снижение интеллекта различной степени	43,4
15.	Эндокринологические расстройства	6,9

ретракция ахиллова сухожилия и деформация стоп к 6-7 годам развивались у 82% больных. Указанные цифры заметно превосходят аналогичные показатели частоты развития контрактур у больных ПМДД в других популяциях [Темин П.А. и др., 1997; Emery A.E.H., 1993]. Отмеченная нами особенность может быть связана с бытовой традицией сидеть на полу, свойственной таджикскому этносу; своеобразии возникающих при этом позно-тонических физиологических реакций, по-видимому, имеет существенное патогенетическое значение, особенно в случае появления мышечных симптомов на ранней стадии развития опорно-двигательного аппарата. Данное наблюдение важно для разработки ранних профилактических мероприятий и рекомендаций в отношении позного и двигательного режима, направленных на предотвращение контрактур у больных детей.

Еще одной характерной особенностью обследованной серии случаев ПМДД явилась высокая частота сочетания двигательных симптомов с задержкой умственного развития (43,4% больных), а также с разнообразными аномалиями развития и врожденными стигмами - гипертелоризмом, эпикантом, прогнатизмом, деформациями ушных раковин и др. (67,2% больных). Последнее, наиболее вероятно, обусловлено высоким уровнем инбридинга в обследованной популяции и выщеплением на этом неблагоприятном генетическом «фоне» у больных ряда дополнительных аутосомно-рецессивных фенотипических признаков.

В обследованной выборке больных выявлены 3 случая ПМДД у девочек из 2 неродственных семей. Фенотип заболевания в основных своих проявлениях не отличался от «классических» описаний ПМДД, включая наличие типичной кардиомиопатии и (в одном случае) умственной отсталости; при этом тяжесть клинических проявлений болезни и характер ее течения у девочек были меньшими

по сравнению с аналогичными характеристиками у сибсов и других больных мужского пола. Более «мягкое» течение болезни в этих случаях, соответствующее литературным данным [Emery A.E.H., 1991], может быть связано с модифицирующим влиянием нормальной копии гена дистрофина, тогда как сам факт развития ПМДД в такой ситуации является, наиболее вероятно, результатом эффекта аномальной лайонизации X-хромосомы [Griggs R., Fischbeck K., 1992; SpechtL.,KunkelL., 1993].

При обследовании больных ПМДД в Таджикистане нами сделан ряд уникальных наблюдений сочетанных форм патологии. У одного из пробандов было выявлено сочетание ПМДД с диффузной ладонно-подошвенной кератодермией конечностей - самостоятельным аутосомно-доминантным заболеванием, которое в семье сегрегировало независимо от первично-мышечной патологии. Еще в одной семье у 3 лиц мужского пола было обнаружено редкое сочетание ПМДД с гемофилией, гены которых локализованы, соответственно, на коротком и длинном плечах X-хромосомы [Forrest S.M. et al, 1988; Boyd Y. et al, 1984; Oberle I. et al., 1985]. Можно заключить, что в данном случае в материнских гаметах оба соответствующих мутантных гена - были локализованы в пределах одного X-хромосомного сегмента, не затрагиваемого в процессе мейотического кроссинговера и наследуемого как единое целое.

У 25 больных ПМДД из 23 семей нами впервые в Таджикистане проведен молекулярный анализ гена дистрофина - прямой скрининг на наличие мажорных делеций путем мультиплексной амплификации набора наиболее часто мутирующих экзонов гена (экзоны 3,6, 8,13,17,19,32,43,44,45,47,48, 50, 52,60 и промоторная область). Пример ДНК-анализа представлен на рисунке 3.

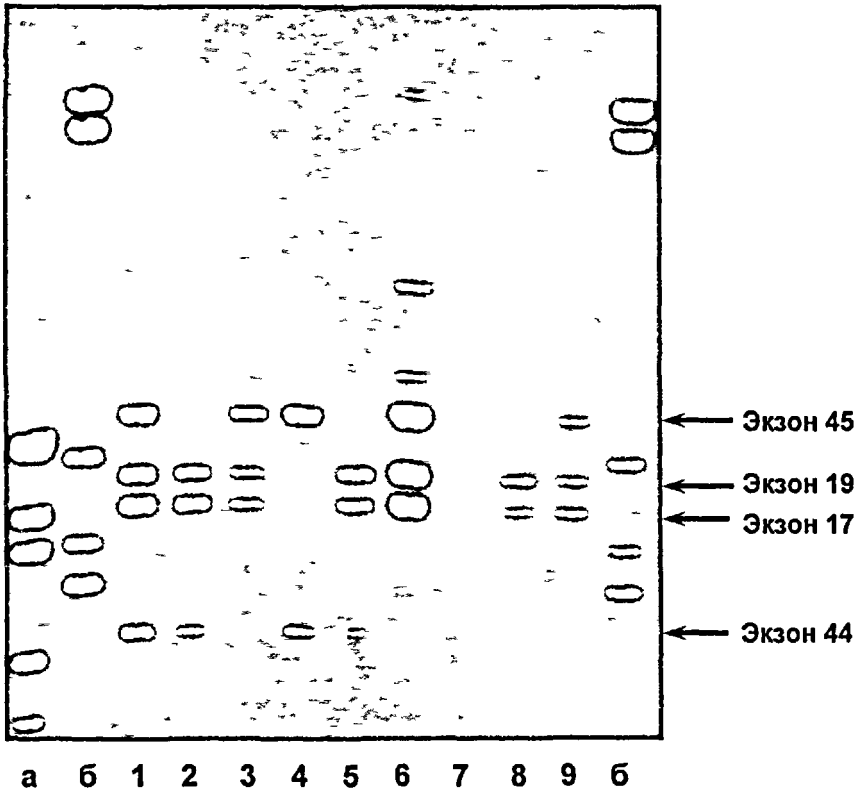


Рисунок 3. Делеционный анализ гена дистрофина у больных ПМДД.

В мультиплексной ПЦР амплифицированы экзоны 17, 19, 44 и 45.

а - маркер длины фрагментов рUC 18/Msp I,

б - маркер длины фрагментов рBR 322/Taq I,

дорожки 1-9 - ДНК больных ПМДД:

1 - экзоны 17, 19, 44 и 45 сохранены;

2 - делеция экзона 45;

3 - делеция экзона 44;

4 - делеция экзонов 17 и 19;

5 - делеция экзона 45;

6 - делеция экзона 44;

7, 8, 9 - контрольные образцы с переменными делециями

Суммарно делеции дистрофина выявлены у 13 больных и 11 семей (48% обследованных семей с ПМДД) - см. таблицу 5. Такая эффективность установления молекулярного дефекта при мультиплексной ПЦР вполне соответствует мировой практике, сложившейся в последние годы с внедрением современных протоколов ПЦР: показано, что по мере увеличения числа исследуемых экзонов становится возможным выявлять до 98% всех протяженных делеций гена дистрофина [Горбунова В.Н. и др., 2000; Иллариошкин С.Н., Иванова-Смоленская И.А., 1998; Иллариошкин С.Н. и др., 2002; Baranov V.S. et al., 1993; Beggs A.H. et al., 1990; Multicenter Study Group, 1992; Дадали Е.Л., 1999].

Выявленные делеции были достаточно полиморфными с точки зрения их локализации и длины (см. таб. 5). На рисунке 4 представлена частота выявления делеций отдельных экзонов гена дистрофина в Таджикистане в сравнении с аналогичными данными, полученными из работ О.В.Евграфова [Евграфов О.В., 1992], В.С.Баранова с соавт. [Baranov V.S. et al., 1993] и Т.А.Ледашевой [Ледашева Т.А., 2000] для европейской (северо-западной и центральной) части России. На данной диаграмме заметны различия в относительной встречаемости дефектов сравниваемых участков гена. Можно отметить, что для Таджикистана оказалось характерным преобладание сравнительно коротких дефектов гена, затрагивающих от одного до нескольких экзонов. Как видно в таб. 5 и на рис. 4, особенностью «молекулярной анатомии» дистрофинопатий в таджикской популяции является преобладание дистальных делеций дистрофина: нами в 73% случаев ПМДД с установленным дефектом выявлена одна из точек разрывов гена дистальнее экзона 50. В целом, в Таджикистане для 91% неродственных пробандов с делениями гена дистрофина дефекты ДНК обнаружены нами в районе экзонов 44-60. Это заметно

контрастирует с большинством других изученных популяций мира, для которых характерна, наряду с наличием такой же дистальной «горячей точки», дополнительная кластеризация делений в проксимальной области гена - промотерная зона и экзоны 1-20 [Иллариошкин С.Н. и др., 2003; Danieli G.A. et al, 1992; Imoto Natsuki et al., 1992; Lindlof M. et al, 1989; Upadhyaya M. et al., 1990].

Таблица 5. Результаты определения методом мультиплексной ПЦР делеций промотерной области и отдельных экзонов гена дистрофина у больных ПМДД.

Больные и семьи	Эзоны гена, промотерная область (Pm)															
	Pm	3	6	8	13	17	19	32	43	44	45	47	48	50	52	60
2-2, 2-4	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
7-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
10-1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
12-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
22-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
23-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
24-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
26-1, 26-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
27-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
29-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
% (ПМДД)*	-	-	-	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3	9	9	22	22	35	4,3	4,3
%(del)**	-	-	-	9	9	9	9	9	9	18	18	45	45	72	9	9

Примечание: + - наличие исследуемого фрагмента гена дистрофина;
 - - делеция фрагмента ДНК (отсутствие фрагмента гена);
 * - % выявления делеций гена среди всех обследованных пробандов с ПМДД (23 семьи);
 ** - встречаемость конкретных делеций гена (%) среди больных с выявленными делециями гена дистрофина.

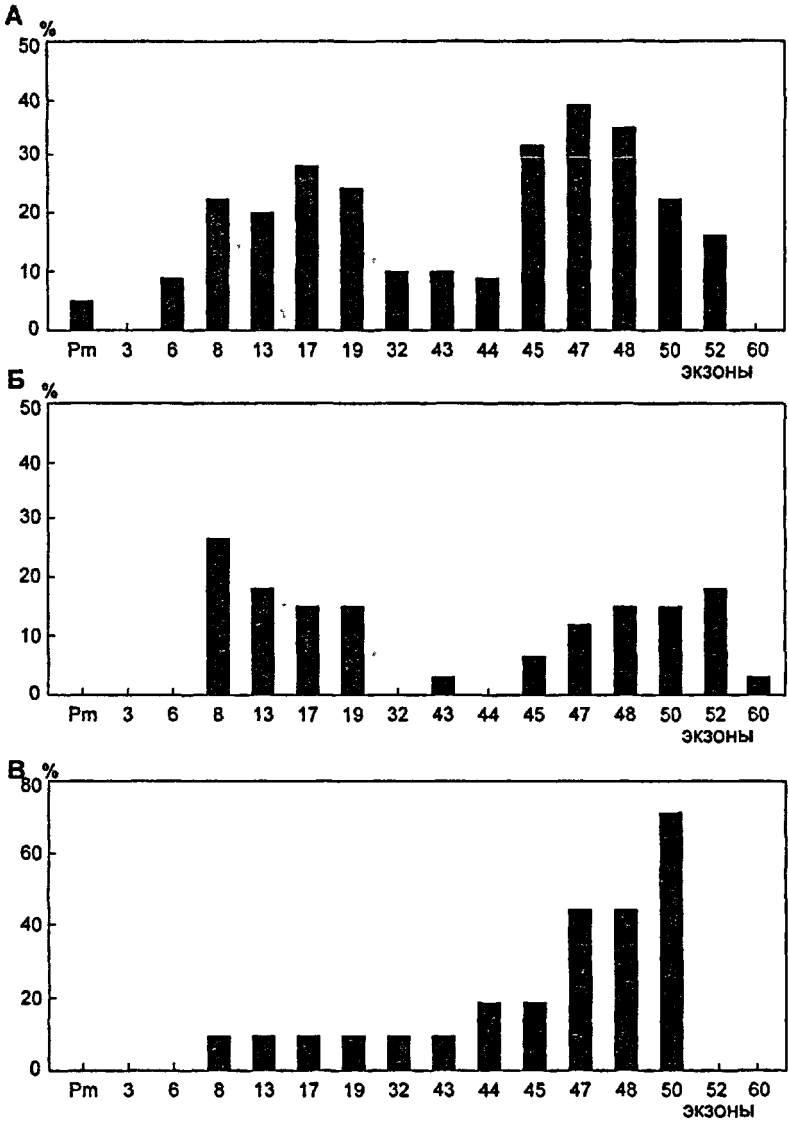


Рисунок 4. Частоты делеций отдельных экзонов гена дистрофина в различных популяциях.

А - центральный регион России [Евграфов О.В., 1992];

Б - северо-западный регион России [Ледашева Т.А., 2000];

В - Таджикистан [настоящее исследование].

Полученные в настоящей работе данные имеют большое значение для оптимизации прямой ДНК-диагностики ПМДД в таджикской популяции и рационального выбора амплифицируемых областей гена при проведении мультиплексного ПЦР-анализа.

С целью косвенной ДНК-диагностики ПМДД мы исследовали ПДФ-полиморфизм по двум локусам системы рERT: 87-8/TaqI и рERT 87-15/Vam HI. Анализ полиморфных систем рERT 87 был проведен в 23 семьях, имеющих больных ПМДД детей. При этом 16 семей оказались информативными (матери пробандов были гетерозиготны) хотя бы по одному локусу, 5 семей - неинформативными. Нами обнаружены 2 случая рекомбинаций в гене дистрофина, что может потенциально явиться источником ошибок при интерпретации результатов косвенного ДНК-анализа и подтверждает необходимость использования комбинированных подходов ДНК-диагностики для улучшения медико-генетического консультирования (например, использование более широкого спектра варибельных локусов - внутригенных и фланкирующих, включая микросателлитные маркеры).

В двух семьях с помощью зонда рERT 87-15/VamHI у больных были обнаружены делеции исследуемой области гена, причем в одной из этих семей проведенный ранее прямой мультиплексный ДНК-анализ не выявил структурных аномалий. Таким образом, суммарно в таджикской выборке случаев ПМДД при использовании комбинированных методов молекулярного анализа дефекты в гене дистрофина выявлены нами в 52% обследованных семей.

3.3. Клинико-генетический анализ и картирование гена эссенциального тремора в семьях северотаджикского изолята

Самостоятельный раздел настоящего исследования был посвящен анализу генетического сцепления и фенотипических особенностей эссенциального тремора, выявленного нами в группе семей из северотаджикского горного изолята в Исфаринском районе Таджикистана (регион указан стрелкой на рис. 1). С целью обследования соответствующих семей нами были организованы повторные экспедиции в данный регион в 1998 и 1999 гг.

Некоторые родословные, в которых был проведен анализ гаплотипов (см. далее), показаны на рисунке 5. Всего же в изоляте были обследованы 19 больных с достоверным диагнозом эссенциального тремора и аутосомно-доминантным наследованием болезни (5 семей), а также 30 их клинически здоровых родственников.

С учетом определенного фенотипического сходства эссенциального тремора с идиопатической дофа-нечувствительной дистонией (при последнем заболевании, в частности, нередко описывается постуральный тремор конечностей) [Маркова Е.Д., 1989; Baxter D.W., Lai S., 1979], на начальном этапе работы нами проведен анализ носительства мажорной мутации 946-948delGAG в гене *DYT1*, ответственном за развитие идиопатической дофа-нечувствительной дистонии [Ozelius L.J. et al., 1997]. Анализ был проведен у пробандов в таджикских семьях в сопоставлении с 11 русскими больными эссенциальным тремором (из банка данных нейрогенетического отделения НИИ неврологии РАМН). Прямой ДНК-анализ не выявил делеции в гене *DYT1* у обследованных больных. Это совпадает с результатами, полученными ранее при оценке генетического сцепления в семьях с эссенциальным тремором [Conway

D. et al., 1993; Durr A. et al., 1993], и позволяет на основании прямой ДНК-диагностики подтвердить в таджикской популяции генетическую и нозологическую самостоятельность эссенциального тремора по отношению к идиопатической дофаминчувствительной дистонии.

В дальнейшей работе по идентификации хромосомного локуса эссенциального тремора в группе таджикских семей нами был использован «кандидатный» подход — оценка сцепления в изучаемых семьях с кандидатными локусами *ETM1* [Gulcher J.R. et al., 1997] и *ETM2* [Higgins J.J. et al., 1997; 1998], картированными на хромосомах 3q13 и 2p22-25.

В наиболее обширной из обследованных семей (семье *Аш.*, 7 больных в 3 поколениях), при анализе парного сцепления с кандидатными локусами на хромосомах 2p и 3q нами были получены негативные Лод-баллы по всем исследованным маркерам (таблица 6), что позволяет достоверно исключить локализацию мутантного гена в критических участках 2-й и 3-й хромосом. Это достоверно свидетельствует о дальнейшей генетической гетерогенности эссенциального тремора и существовании еще одного локуса данного заболевания. Важно отметить, что фенотип эссенциального тремора в данной семье имел ряд особенностей, таких как: антиципация с «омоложением» болезни на 20-30 лет в нижних поколениях родословной; отчетливый интенционный компонент тремора; выраженный и инвалидизирующий характер дрожания. Феномен антиципации в семье позволяет предполагать «динамический» характер мутации - по типу экспансии тринуклеотидных повторов [Иллариошкин С.Н. и др., 2003; Willems P.J., 1994]. Указанные отличия фенотипа болезни в семье *Аш.* косвенно подтверждают нозологическую самостоятельность данного варианта эссенциального тремора.

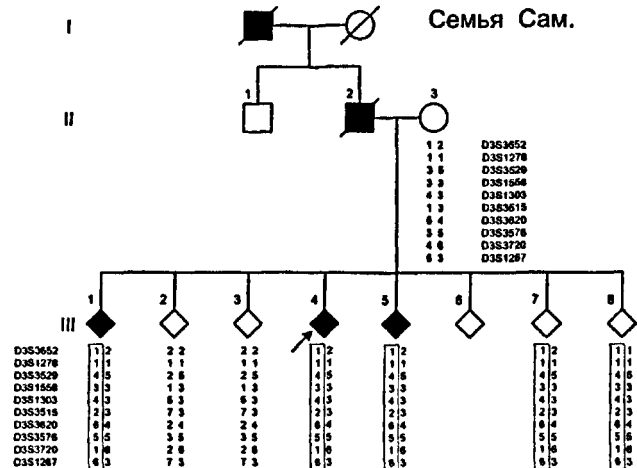
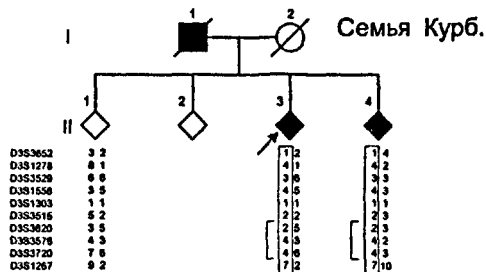
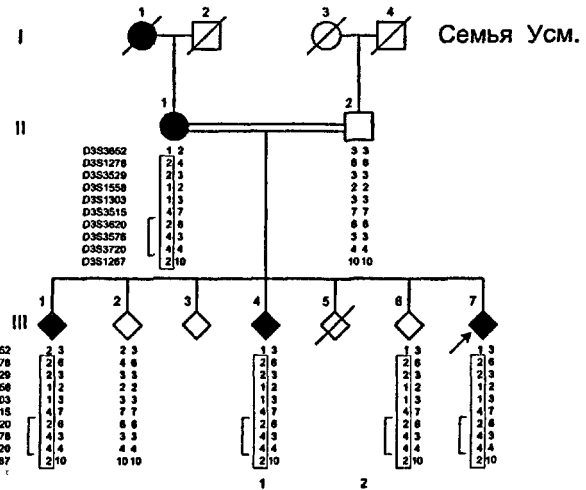
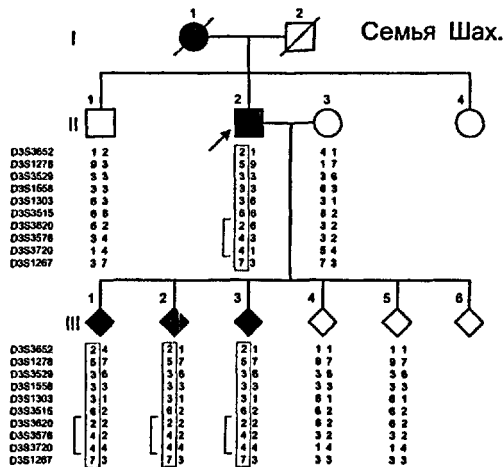


Рисунок 5. Родословные обследованных семей с эссенциальным тремором и выявленные гаплотипы по серии маркеров, сцепленных с хромосомой 3q13.

«Мутантный» гаплотип в каждой семье обведен контуром; квадратной скобкой указан общий гаплотип по маркерам D3S3620, D3S3576 и D3S3720.

Таблица 6. Результаты анализа парного сцепления болезни с изучаемыми локусами в семье Аш.

Локус	Доля рекомбинантов					
	0,00	0,01	0,05	0,10	0,20	0,30
D3S3529	-6,31	-2,50	-1,16	-0,60	-0,15	0,00
D3S3620	-4,82	-2,88	-1,52	-0,92	-0,38	-0,14
D3S1267	-6,78	-3,08	-1,66	-1,03	-0,43	-0,16
D2S131	-1,34	-1,11	-0,68	-0,42	-0,16	-0,06
D2S224	-6,67	-3,10	-1,68	-1,05	-0,44	-0,16

В остальных 4 семьях с эссенциальным тремором (Шах., Курб., Уем. и Сам. на рис.5) нами были получены положительные значения Лод-баллов для локуса *ETM1* на хромосоме 3q13. Результаты анализа парного генетического сцепления с 7 из 10 исследованных полиморфных генетических маркеров, покрывающих участок протяженностью 20 сМ в локусе 3q13, представлены в таблице 7. Принимая во внимание тот факт, что значения Лод-баллов для конкретных маркеров в значительной степени зависят от их информативности в исследуемых семьях, мы при расчете сцепления использовали единый гаплотип в качестве дополнительного маркерного показателя (см. рис. 5 и таб. 7). Указанный подход позволил получить максимальный комбинированный Лод-балл $Z=2,46$ при доле рекомбинантов $\theta=0,00$. Результаты расчетов мультилокусного сцепления подтвердили наиболее вероятную локализацию мутантного гена эссенциального тремора в области 3q13, с максимальным комбинированным Лод-баллом $Z=3,35$ для маркера D3S3515.

Таблица 7. Результаты анализа парного сцепления эссенциального тремора в таджикских семьях с маркерами в локусе 3q13.

Маркер	Семья	Доля рекомбинантов						Z_{max}	θ_{max}
		0,00	0,01	0,05	0,10	0,20	0,30		
D3S1278	Шах.	1,12	1,09	0,99	0,85	0,58	0,31		
	Курб.	0,59	0,58	0,53	0,47	0,33	0,18		
	Усм.	0,05	0,05	0,04	0,03	0,01	0,00		
	Сам.	0,29	0,28	0,25	0,20	0,13	0,06		
	Суммарно	2,05	2,00	1,81	1,55	1,05	0,55		
D3S3529	Шах.	-0,50	-0,46	-0,35	-0,25	-0,12	-0,05		
	Курб.	0,59	0,58	0,53	0,47	0,33	0,18		
	Усм.	0,07	0,09	0,16	0,21	0,21	0,15		
	Сам.	0,29	0,28	0,25	0,20	0,13	0,06		
	Суммарно	0,45	0,49	0,59	0,63	0,55	0,34		
D3S1303	Шах.	0,37	0,38	0,41	0,41	0,34	0,21		
	Курб.	0,59	0,58	0,53	0,47	0,33	0,18		
	Усм.	0,41	0,41	0,41	0,38	0,30	0,19		
	Сам.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
	Суммарно	1,37	1,37	1,35	1,26	0,97	0,58		
D3S3515	Шах.	-0,52	-0,48	-0,36	-0,26	-0,13	-0,05		
	Курб.	0,59	0,58	0,53	0,47	0,33	0,18		
	Усм.	0,46	0,46	0,44	0,41	0,32	0,19		
	Сам.	0,29	0,28	0,25	0,20	0,13	0,06		
	Суммарно	0,82	0,84	0,86	0,82	0,65	0,38		
D3S3620	Шах.	0,61	0,61	0,57	0,52	0,39	0,22		
	Курб.	0,59	0,58	0,53	0,47	0,33	0,18		
	Усм.	0,24	0,25	0,27	0,29	0,26	0,17		
	Сам.	0,12	0,11	0,10	0,08	0,05	0,02		
	Суммарно	1,56	1,55	1,47	1,36	1,03	0,59		
D3S3720	Шах.	0,43	0,44	0,45	0,44	0,35	0,21		
	Курб.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
	Усм.	0,75	0,74	0,69	0,62	0,45	0,25		
	Сам.	0,29	0,28	0,25	0,20	0,13	0,06		
	Суммарно	1,47	1,46	1,39	1,26	0,93	0,52		
Единый гаплотип	Шах.	1,12	1,09	0,99	0,85	0,58	0,31		
	Курб.	0,59	0,58	0,53	0,47	0,33	0,18		
	Усм.	0,46	0,46	0,44	0,41	0,32	0,19		
	Сам.	0,29	0,28	0,25	0,20	0,13	0,06		
	Суммарно	2,46	2,41	2,21	1,93	1,36	0,74		

При проведении тонкого генетического картирования в семьях Шах., Курб. и Уем. у всех больных нами был выявлен общий гаплотип, охватывающий три последовательных маркерных локуса D3S3620, D3S3576 и D3S3720 (см. рис. 5). Идентификация общего гаплотипа, ко-сегрегирующего с патологическим фенотипом эссенциального тремора и не обнаруженного у некровных родственников (супругов) в обследованных семьях, является, наиболее вероятно, следствием «эффекта основателя» и может служить дополнительным важным подтверждением сцепления гена болезни с хромосомой 3. Данный «мутантный» гаплотип покрывает сравнительно короткий участок длиной 2 сМ в хромосомной области 3q13 и свидетельствует о локализации гена эссенциального тремора между маркерами D3S3620 и D3S3720, что соответствует позиции локуса *ETM1*, установленной J.Gulcher с соавторами (1997).

У трех клинически здоровых младших сибсов из 2 обследованных семей (III-6 в семье Уем., а также III-7 и III-8 в семье Сам. - см. рис. 5) мы выявили носительство «мутантного» гаплотипа по маркерам D3S3620, D3S3576 и D3S3720. Принимая во внимание наиболее молодой возраст этих индивидов в соответствующих «ядерных» семьях, отсутствие отчетливого тремора у них может быть, наиболее вероятно, объяснено возраст-зависимой пенетрантностью мутантного гена эссенциального тремора [Bain P.G. et al., 1994].

Таким образом, нами в изученной популяции показана генетическая идентичность болезни с «исландским» вариантом эссенциального тремора [Gulcher J. et al., 1997]. Настоящая работа является лишь третьей работой в мире, в которой удалось получить положительные результаты linkage-анализа в семьях с аутосомно-доминантным эссенциальным тремором. Фенотип болезни в 3q13-сцепленных

семьях, по нашим данным, не имеет каких-либо существенных различий в сравнении с классическими описаниями данного заболевания [Давиденков С.Н., 1932; Иванова-Смоленская И.А., 1979; 1986; Bain P.G. et al., 1994; Lou J.S., Jankovic J., 1991].

Дальнейшие перспективы генетического анализа заболевания в таджикской популяции могут быть связаны: а) с выявлением новых семей, информативных для linkage-анализа (возможность выявления новых рекомбинаций и* сужения изучаемого локуса *ETMI*); б) с анализом неравновесного сцепления в новой серии семейных и изолированных случаев эссенциального тремора из данного изолята и ближайших регионов Таджикистана (идентификация общих аллелей по ключевым маркерам в связи с потенциальным «эффектом основателя»). Все это позволит значительно сократить размер изучаемого локуса, сделав возможным прямой мутационный скрининг генов-кандидатов, расположенных в «зоне интереса».

3.4. Совершенствование службы медико-генетического консультирования в Таджикистане

Полученный нами в процессе выполнения настоящей работы опыт популяционного-генетического и молекулярного анализа наследственных неврологических заболеваний может стать основой для создания современной системы медико-генетического консультирования и регистра данных заболеваний в Таджикистане. В настоящий момент такая служба создается Минздравом республики при нашем активном участии; ее основа представлена на рисунке 6. Она функционирует как составная часть системы лечебно-профилактических учреждений практического здравоохранения, осуществляет свои мероприятия в координации с акушерской, педиатрической, неврологической и другими службами.

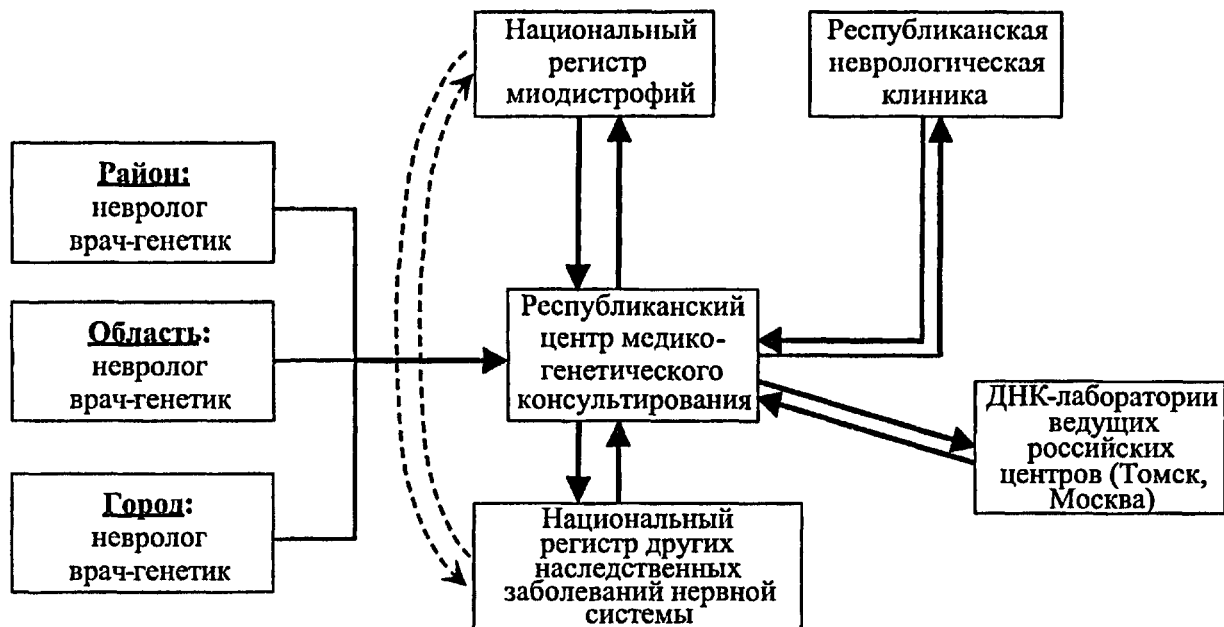


Рисунок 6. Схема взаимодействия лечебно-диагностических учреждений республики с медико-генетическим центром, национальными регистрами наследственных заболеваний нервной системы и ДНК-лабораториями ведущих научных центров России.

Как видно на рис. 6, территориальная инфраструктура медико-генетической службы состоит из 3 уровней, основана на максимальном приближении к обслуживаемым контингентам населения и развитию ресурсов здравоохранения для обеспечения гарантируемых видов помощи семьям с наследственной и врожденной патологией: медико-генетическое консультирование, пренатальная диагностика, скрининг новорожденных на поддающиеся коррекции наследственные болезни, социально-медицинская реабилитация больных и отягощенных семей.

Важной составной частью системы медико-генетической помощи населению Таджикистана является обеспечение возможности проведения ДНК-диагностики наследственных заболеваний, в том числе (с учетом сложности создания специализированной лаборатории) - на базе ведущих региональных центров, сотрудничающих со специалистами Республики Таджикистан. Примером такого сотрудничества является наш опыт, который позволил осуществить первую ДНК-диагностику наследственных болезней нервной системы в таджикских семьях, а также реализовать взаимодействие медико-генетической службы Таджикистана с профильными ДНК-лабораториями НИИ медицинской генетики Томского научного центра РАМН и НИИ неврологии РАМН. На этой основе создана принципиальная возможность проведения ДНК-тестирования больных и лиц из группы риска из таджикских семей, отягощенных ПМД Дюшенна, наследственными дистониями, эссенциальным тремором и другими моногенными болезнями нервной системы. Расширение и внедрение полученного опыта (в т.ч. на основе обучения специалистов, организации совместных семинаров и экспедиций и др.) имеет важнейшее значение для профилактики наследственной патологии и уменьшения «генетического» груза в популяции Республики Таджикистан.

ВЫВОДЫ

1. Генетика-эпидемиологическое изучение регионов Таджикистана выявило чрезвычайную вариабельность значений распространенности наследственных болезней нервной системы: в Кулябской области их общая распространенность составила 10,4 на 100 000 населения, а в Колхозабадском и Хочамастонском районах Курган-Тюбинской области - 57,0 и 73,3 на 100 000 населения, соответственно. Указанные различия могут быть обусловлены действием неблагоприятных регион-специфичных факторов мутагенеза (например, агрессивное агрохимическое производство на территории Курган-Тюбинского региона и др.).
2. В общей таджикской популяции распространенность отдельных форм прогрессирующих мышечных дистрофий составляет: ПМД Дюшенна - 5,6 на 100 000, конечностно-поясная форма ПМД - 2,7 на 100 000 населения. Отмечено значительное преобладание спорадических случаев ПМД над семейными.
3. Для популяции Таджикистана характерно преобладание в структуре груза наследственной неврологической патологии заболеваний с аутосомно-рецессивным типом наследования (от 62,0% до 73,3% всех семей), что связано с высоким уровнем случайного инбридинга и/или генеалогической брачной ассортативностью. Отличительной популяционной особенностью изучаемой патологии в Таджикистане является неравномерность распределения случаев заболеваний по территории обследованных регионов, с накоплением определенных форм в отдельных субпопуляциях.
4. В таджикской популяции впервые описан ряд редких фенотипов и сочетанных

форм наследственных заболеваний нервной системы: осложненная форма аутосомно-рецессивного блефароспазма; вариант конечностно-поясной ПМД с преимущественным вовлечением аксиальной мускулатуры; конечностно-поясная ПМД с синдромом Жильбера; ПМД Дюшенна с диффузной ладонно-подошвенной кератодермией конечностей; ПМД Дюшенна с гемофилией.

5. Установлен ряд особенностей симптоматики и течения ПМД Дюшенна, характерных для больных в таджикской популяции:
 - раннее (спустя 3-5 лет от начала болезни) наступление декомпенсации двигательных функций, обусловленное традицией сидеть на полу и возникающей в связи с этим тенденцией к более раннему развитию контрактур в коленных и голеностопных суставах;
 - высокая частота сочетания двигательных симптомов с задержкой умственного развития (43,1% больных), а также с разнообразными аномалиями развития и врожденными дизрафическими стигмами - гипертелоризмом, эпикантом, прогнатизмом и др. (67,2% больных).
6. При комбинированном молекулярно-генетическом анализе (мультиплексный делеционный скрининг + анализ полиморфных локусов системы рERT 87) делеции в гене дистрофина выявляются в 52% таджикских семей с ПМД Дюшенна, в том числе при использовании мультиплексной ПЦР - в 48% обследованных семей.
7. Особенностью спектра делеций гена дистрофина в таджикской популяции является преобладание сравнительно коротких дефектов, затрагивающих от

одного до нескольких экзонов гена. В 91% таджикских случаев ПМД Дюшенна с идентифицированными мутациями (43,5% всех обследованных больных) выявлена «горячая точка» делеций в дистальной части гена (экзоны 44-50). Для таджикской популяции характерна низкая частота мутирования проксимальной области дистрофина, часто вовлекаемой в делеций у больных из других популяций мира.

8. В группе таджикских семей с аутосомно-доминантным эссенциальным тремором установлено генетическое сцепление болезни с локусом *ETM1* на хромосоме 3q13. Проведенное нами тонкое генетическое картирование данного локуса позволило локализовать мутантный ген на участке длиной 2 сМ, фланкируемом маркерами D3S3620 и D3S3720.
9. Анализ генетического сцепления в одной из обследованных семей исключил локализацию мутантного гена в хромосомных областях 2p22-25 и 3q13, что свидетельствует о существовании еще одного локуса данного заболевания. Клиническими особенностями указанного генетического варианта эссенциального тремора являются феномен антиципации, интенционный компонент дрожания и его инвалидирующий характер по мере прогрессирования болезни.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Высокая распространенность наследственных заболеваний нервной системы в ряде регионов Таджикистана (юг республики) диктует необходимость реализации ряда мер в системе органов здравоохранения - таких как

первоочередное развертывание служб медико-генетического консультирования и санитарного просвещения в указанных регионах с целью первичной профилактики наследственной неврологической патологии и уменьшения «генетического груза» в популяции Таджикистана.

2. В связи с повышенной склонностью к раннему развитию контрактур в крупных суставах, характерному для больных ПМД Дюшенна в таджикской популяции, особое внимание при ведении пациентов следует уделять соответствующим профилактическим мероприятиям (изменение позных и двигательных стереотипов больных, разработка и применение рациональных комплексов лечебной физкультуры, массажа и других методов физической реабилитации, инструктаж и обучение родственников и др.).
3. В таджикской популяции при обследовании больных с подозрением на ПМД Дюшенна наиболее диагностически значимыми являются пары олигонуклеотидных праймеров, амплифицирующих экзоны 47, 48 и 50 гена дистрофина. Это обосновывает первоочередную целесообразность исследования указанных областей гена при разработке экономного и рационального алгоритма мутационного скрининга у больных ПМД Дюшенна в Таджикистане.
4. Получен первый в Таджикистане опыт прямой и косвенной ДНК-диагностики некоторых форм наследственных заболеваний нервной системы, с информированием врачей-неврологов и генетиков республики о соответствующих возможностях медико-генетического консультирования. Предложена модель для оказания медико-генетической помощи населению Таджикистана, в том числе с использованием комбинированных методов ДНК-анализа

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ НАУЧНЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ -

1. Генетико-демографическая характеристика сельской популяции юга Таджикистана // Генетика человека и патология. Материалы 2-й итоговой конференции НИИ мед. генетики ТНЦ РАМН. - Томск, ТГУ, 1992. - С.6-8 (соавт. Дьяченко Е.Н., Раджабалиев Ш.Ф., Иванова О.Ф., Кучер А.Н.).
2. Медико-генетическая характеристика наследственных болезней Кулябской области Таджикистана // Генетика человека и патология. Материалы 2-й итоговой конференции НИИ мед. генетики ТНЦ РАМН. - Томск, ТГУ, 1992. - с.37-38 (соавт. Салокова О.А., Пузырева О.А., Назаренко Л.Л., Раджабалиев Ш.Ф., Хакназаров А., Пузырев В.П.).
3. Популяционно-генетическая характеристика сельской популяции юга Таджикистана // Генетика. 1993. - Т.29. - №8. - С. 1375-1381 (соавт. Дьяченко Е.И., Пузырев В.П., Кучер А.Н., Иванова О.Ф., Раджабалиев Ш.Ф.).
4. Генетический полиморфизм биохимических и иммунологических маркеров генов в сельской популяции юга Таджикистана // Здравоохранение Таджикистана 1993. - №2. - С.22 (соавт. Раджабалиев Ш.Ф., Дьяченко Е.Н., Пузырев В.Л., Кучер А.Н., Иванова О.Ф.).
5. Изучение генетических факторов в формировании уровня здоровья сельского населения юга Таджикистана // Материалы годичной 42-й научной конференции Госмедуниверситета им. Абуали ибн Сино «Актуальные вопросы профилактики болезней человека». Душанбе, 1994. - С.139—140 (соавт. Кучер А.Н., Пузырев В.П.).
6. Наследственная патология в Кулябской области Таджикистана // Материалы годичной 42-й научной конференции Госмедуниверситета им. Абуали ибн Сино «Актуальные вопросы профилактики болезней человека». Душанбе, 1994. - С.139—140 (соавт. Пузырев В.П., Пузырева О.А., Назаренко Л.П., Ахмедов А.А.).
7. Эпидемиология наследственных болезней в Кулябской области Таджикистана (предварительное сообщение) // Здравоохранение Таджикистана. 1993. - №6. - С.42-44 (соавт. Раджабалиев Ш.Ф., Салокова О.А., Назаренко Л.П., Пузырева О.А.).
8. Эпидемиология миодистрофии Эрба-Рота в Таджикистане // Здравоохранение Таджикистана. 1993. - №4. - С.33-37 (соавт. Раджабалиев Ш.Ф., Хамиджаев М.М.).
9. Анализ делеций гена дистрофина у больных с миодистрофией Дюшенна в Таджикистане // Генетика. 1994. - Т.10. - С.1370-1378 (соавт. Одинакова О.Н., Пузырев В.П., Раджабалиев Ш.Ф.).
10. Генетическое консультирование на основе исследования гена дистрофина // Актуальные вопросы региональной патологии и оптимизации учебного процесса. Душанбе, 1995. - С.72 (соавт. Пузырев В.П., Раджабалиев Ш.Ф.).

11. Наследственная патология у жителей Кулябской зоны Хатлонской области Таджикистана // Здравоохранение Таджикистана. 1995. - №1. - С.79 (соавт. Назаренко Л.П., Салокова О.А., Раджабаев Ш.Ф., Пузырев В.П., Пузырева О.А.).
12. Изучение генетических факторов в формировании уровня здоровья сельского населения Таджикистана // Здравоохранение Таджикистана. 1995. - №2. - с.75 (соавт. Кучер А.Н., Пузырев В.П.).
13. Картирование гена эссенциального тремора в семьях северо-таджикского изолята // В сб.: «Новые технологии в неврологии и нейрохирургии на рубеже тысячелетий» (материалы Российского Конгресса): Тезисы докл. Ступино, 1999. - С.77 (соавт. Иллариошкин С.Н., Иванова-Смоленская И.А., Маркова Е.Д.)-
14. Анализ генетического сцепления в семьях с наследственной формой эссенциального тремора // В сб.: Второй (четвертый) Российский съезд медицинских генетиков: Тезисы докл. (Часть первая). Курск, 2000. - С.132-133 (соавт. Иллариошкин С.И., Иванова-Смоленская И.А., Маркова Е.Д.).
15. Clinical and genetic analysis of essential tremor in Russia and other countries of the former Soviet Union // Mov. Disord. 2000. - Vol.15 (Suppl.3). - P.198 (соавт. Ivanova-Smolenskaya I.A., Illarioshkin S.N., Markova E.D., Brice A.).
16. Clinical and genetic study of familial essential tremor in an isolate of Northern Tajikistan // Mov. Disord. 2000. - Vol.15. - P.1020-1023 (соавт. Ivanova-Smolenskaya I.A., Illarioshkin S.N., Markova E.D., Brice A., Stevanin G.).
17. Эссенциальный тремор или болезнь Минора // Сборник научных трудов Таджикского НИИ профилактической медицины. - Душанбе, 2000. - С.193-195 (соавт. Иллариошкин С.Н., Иванова-Смоленская И.А.)
18. Молекулярно-генетический анализ эссенциального тремора и семейной формы болезни Паркинсона // В сб.: VIII Всероссийский съезд неврологов: Тезисы докл. - Казань. 2001. - С.332 (соавт. Иллариошкин С.Н., Иванова-Смоленская И.А., Маркова Е.Д., Загоровская Т.Б.).
19. Структура наследственных заболеваний нервной системы в южном регионе Республики Таджикистан // Материалы Республиканской научно-практической конференции, посвященной 10-летию независимости Республики Таджикистан. - Душанбе, 2001. - С.301-305 (соавт. Нажмидинова М.Н.).
20. Современные технологии картирования генов наследственных заболеваний на примере болезней нервной системы // В сб.: Материалы Третьей международной научно-практической конференции «Здоровье и образование в XXI веке»: Тезисы

- докл. - Москва, 2002. - С. 207 (соавт. Иллариошкин С.Н., Иванова-Смоленская И.А., Маркова Е.Д., Полещук В.В., Сломинский П.А.).
21. Молекулярно-генетический анализ эссенциального тремора // Генетика. 2002. - Т.38. - С.1704-1709 (соавт. Иллариошкин С.Н., Иванова-Смоленская И.А., Брис А., Маркова Е.Д., Миклина Н.И., Ключников С.А., Лимборская С.А.).
 22. Современное представление о клинико-генетической и молекулярной основе миодистрофии Дюшенна (Монография). Душанбе, 2001.
 23. Основы медицинской генетики и наследственные болезни нервной системы (на таджикском языке) / Практическое руководство. Душанбе, 2002 (соавт. Пулатов А.М.).
 24. Инфекционные и инфекционно-аллергические заболевания нервной системы (на таджикском языке) / Практическое руководство. Душанбе, 2002 (соавт. Пулатов А.М.).

УСЛОВНЫЕ СОКРАЩЕНИЯ И СПЕЦИАЛЬНЫЕ ТЕРМИНЫ

<i>ETM1, ETM2</i>	-	обозначение хромосомных локусов эссенциального тремора (от англ. " <i>Essential Tremor, Mutated</i> ");
КПМД	—	конечностно-поясная мышечная дистрофия;
Лод (Лод-балл)	-	мера оценки генетического сцепления (от англ. " <i>Logarithm of the Odds</i> " - логарифм соотношения правдоподобий);
ПДРФ	-	полиморфизм длин рестрикционных фрагментов;
ПМД	-	прогрессирующие мышечные дистрофии;
ПМДД	—	прогрессирующая мышечная дистрофия Дюшенна;
ПЦР	-	полимеразная цепная реакция;
ЦНС	-	центральная нервная система.

№ - 2765