

**РГБ ОД**

На правах рукописи

**15 ДЕК 1996**

**РАХМОНОВ**

**Рахматулло Азизович**

**КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ И МОЛЕКУЛЯРНЫЙ  
АНАЛИЗ МИОДИСТРОФИИ ДЮШЕННА  
В ТАДЖИКИСТАНЕ**

**14.00.13 — нервные болезни**

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук**

**Москва — 1996**

Работа выполнена в Научно-исследовательском институте профилактической медицины Министерства здравоохранения Республики Таджикистан и Научно-исследовательском институте медицинской генетики Томского научного центра Российской Академии медицинских наук.

**Научные руководители:**

кандидат медицинских наук **А. А. Ахмедов**

кандидат биологических наук **О. Н. Одиноква**

**Официальные оппоненты:**

Лауреат государственной премии Российской Федерации,  
доктор медицинских наук, профессор **С. А. Лимборская**  
доктор медицинских наук, профессор **И. А. Завалишин**

Ведущее учреждение — Московская Медицинская Академия  
им. И. М. Сеченева

Защита состоится «        » \_\_\_\_\_ 1996 г. в \_\_\_\_\_ часов

на заседании диссертационного совета Д 001.06.01 при Научно-исследовательском институте неврологии Российской Академии медицинских наук по адресу: 123367, Москва, Волоколамское шоссе, 80.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института.

Автореферат разслан «23» октября 1996 г.

**Ученый секретарь**

диссертационного совета,

кандидат медицинских наук

**С. Н. ИЛЛАРИОШКИН**

Актуальность проблемы. Наследственные болезни составляют существенную долю в общей патологии человека, занимая одно из ведущих мест как по многочисленности нозологических форм, так и по многообразию фенотипических проявлений.

В настоящее время накоплен и систематизирован достаточно обширный материал о распространении наследственных болезней в различных популяциях, проанализированы причины накопления "патологических генов" и факторы популяционной динамики (мутация, миграция, структура браков, изоляция, отбор).

Среди наследственных болезней нервной системы наиболее многочисленную группу составляют нервно-мышечные заболевания (Емеву А. Е. Н., 1991). Одной из наиболее частых и злокачественных форм нервно-мышечной патологии является мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) (Burmeister M. et al., 1987). Заболевание носит отчетливо прогрессирующий характер, приводит к смерти больных в конце второго - начале третьего десятилетия жизни (Давиденков С. Н., 1934, Маньковский Н. В., 1960 г. Бадалян Л. О. 1971, 1974). Длительная и тяжелая инвалидизация больных, вынуждающая родственников осуществлять постоянный уход за ними, придает этому страданию социальный характер. Для действенной профилактики МДД необходимо знать не только клинико-генетическую характеристику этого тяжелого заболевания, но и популяционно-географические особенности его распространения, а также разработать подходы к наиболее эффективной молекулярной диагностике МДД.

Цель работы. Изучение клинических проявлений, закономерности распространения и спектра мутаций гена дистрофина у больных мышечной дистрофией Дюшенна и их родственников в таджикской популяции.

В конце 80 годов нашего столетия благодаря значительным успехам молекулярной генетики был достигнут значительный прогресс в понимании сущности патологического процесса при МДД. Было установлено, что в основе болезни лежит дефект гигантского гена, кодирующего структурный белок дистрофин, локализующийся на поверхности мембран мышечных клеток (Hofman et al. 1987; Koenig et al., 1988). Мутации в гене дистрофина, большинство из которых

составляют делеции различной протяженности. Приводят к распаду всего дистрофин-гликопротеинового комплекса и необратимому повреждению мембран миофибрилл (Eryasti, Campbell, 1991; Witrovski, 1998). Указанные открытия позволили практически осуществлять сцепления полиморфных генетических маркеров в отягощенных семьях. Было показано что спектр мутации в гене дистрофина весьма широк (Danieli et al., 1993; Barras et al. 1988; Davies et al., 1988; Nitsuki et al., 1992; Naimann-Seyde et al., 1992; Upadhyaha et al., 1990), в связи с чем оптимизация ДНК-диагностики и медико-генетического консультирования требует детального изучения распределения и характера основных типов мутации в различных популяциях.

Таким образом, для достижения цели при проведении исследований поставлены следующие задачи:

- изучить распространенность и клинические проявления МДД в Таджикистане.

- провести молекулярно-генетический анализ гена дистрофина у больных с МДД и их ближайших родственников.

- сформулировать основные принципы и подходы к организации помощи семьям с больными МДД в Республике Таджикистан.

Научная новизна исследования. Представлено первое полное обобщение данных по клиническому полиморфизму миодистрофии Дюшенна среди населения Таджикистана, имеющего свой исторический путь развития, особенности экологии и традиции в организации социальной сферы жизни. Впервые у больных МДД данного региона описаны делеции гена дистрофина и проведен анализ спектра встречающихся делеций в данном регионе. Эти сведения позволяют обосновать принципы диспансеризации семей с МДД и организации выявления гетерозиготного носительства мутантного гена среди населения Таджикистана.

Научно-практическая значимость. Получены эпидемиологические данные по распространенности МДД в Таджикистане, клиническому полиморфизму МДД, что позволило определить оптимальные пути профилактических мероприятий в отношении этой наиболее тяжелой наследственной формы миопатии. Определена диагностическая значимость

исследования отдельных регионов гена дистрофина для диагностики МДД в Таджикистане. Осуществленная в работе детекция мутаций в семьях позволила осуществить корректную и точную диагностику в семьях больных с уже детектированными дефектами гена. Полученные результаты создали основу для проведения пренатальной диагностики МДД в отягощенных семьях, и в настоящее время мы уже приступили к этой работе. Республиканский национальный регистр наследственных болезней дополнен новыми единицами наблюдения, а у наблюдающихся ранее больных уточнен диагноз с использованием молекулярно-генетических методов.

#### Основные положения, выносимые на защиту.

1. Значительная распространенность миодистрофии Дюшенна среди других наследственных заболеваний в Таджикистане, высокий коэффициент инбридинга в отягощенных семьях.

2. Миодистрофия Дюшенна в Таджикской популяции имеет клинические и патогенетические особенности: относительно позднее начало болезни, ранняя декомпенсация, частое сочетание МДД с врожденными стигмами и аномалиями развития, благоприятное течение у девочек.

3. Спектр делеций гена дистрофина в популяции Таджикистана имеет свои характерные особенности по сравнению с другими изученными популяциями, что необходимо учитывать при проведении ДНК-диагностики и медико-генетического консультирования.

Внедрение результатов исследования. Материалы исследований используются при чтении лекций и проведении практических занятий для интернов и специализирующихся по неврологии, а также при проведении цикла "Наследственные заболевания нервной системы" для курсантов Таджикского института последипломной подготовки медицинских кадров. Они включены в программу практических занятий и лекций, для студентов IV курса лечебного и педиатрического факультетов субординаторов по неврологии Таджикского государственного Медицинского университета им. Абуали ибн Сино. Сведения о наличии в регионе больных с МДД переданы руководителям лечебных учреждений. В районах проведены лекции и беседы, выступления по радио и телевидению на тему: "Проблема миодистрофии Дюшенна в Тад-

джикистане". "Польза и вред родственного брака".

Результаты работы внедрены в практическую деятельность в неврологических отделений г. Душанбе, областных больниц г. Курган-Тюбе и Куляба, медико-генетического центра, детской консультативной поликлиники РКБ, диагностического центра.

Агробация работы. Основные положения исследований представлены на: II итоговой конференции НИИ мед. генетики ТНЦ РАМН "Генетико-демографическая характеристика сельской популяции юга Таджикистане" (Томск, 1992); IV итоговой конференции НИИ мед. генетики ТНЦ РАМН "Популяционно-генетическая характеристика сельской популяции юга Таджикистана" (Томск, 1993); 42-ой научной конференции Таджикского госуниверситета им. Абу-али ибн Сино "Изучение генетических факторов в формировании уровня здоровья сельского населения юга Таджикистана" (Душанбе, 1994); научной конференции по проблемам региональной патологии "Генетическое консультирование гена дистрофина" (Душанбе, 1995).

Объем и структура работы. Работа выполнена на \_\_\_\_\_ страницах машинописного текста, состоит из введения, трех глав, заключение, выводов и практических рекомендаций, библиографии, приложений, содержит \_\_\_\_\_ таблиц и \_\_\_\_\_ рисунков.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Клинико-генетический анализ

Этно-демографическая ситуация в Республике Таджикистан в настоящее время характеризуется стремлением к однонациональным бракам, расширенным воспроизводством населения, возвращением переселенцев на прежнее место жительства, продолжающейся миграцией славянского населения за пределы республики. С генетической точки зрения важно отметить сохранение достаточно высокой доли имбридинга (кровнородственных браков) в субпопуляциях таджикского на-

селения. Следовательно, анализ этно-исторических тенденций среди таджикского населения позволяет заключить, что настоящее исследование одной из форм наследственной патологии, в своей генетической основе, будет с высокой степенью вероятности касаться генов идентичных по происхождению. Достаточно большой размер семьи - еще одна из специфических особенностей таджикской популяции, накладывающая свой отпечаток на характер проводимого генетического исследования.

В формировании выборки информативных семей с миодистрофией Дюшенна для детального исследования использован регистр, составленный на кафедре нервных болезней Таджикского Государственного медицинского университета им. Абу али ибн Сино и кафедре нервных болезней Таджикского института последиplomной подготовки медицинских кадров. В основу настоящего исследования семей с МДД положен метод поэтапного их выявления и обследования (табл. 1)

На первом этапе основным источником информации о наличии семей с МДД служили специализированные неврологические стационары - районные, областные, городские и республиканские, затем экспедиционные поездки в районы республики, включая труднодоступные и отдаленные районы республики (Кулябская область). С целью более полного выявления больных с миодистрофией Дюшенна среди населения были привлечены материалы районных, городских и республиканских ВТЭК, архивы клиник города и центральных районных больниц.

Второй этап исследования включал изучение клинико-генеалогических данных в семьях больных с МДД и окончательную верификацию диагноза с использованием дополнительных методов исследования. Для изучения клинического полиморфизма в обследование было включено 225 человек из 127 семей, среди которых было выявлено 170 больных МДД. Все больные и члены их семей клинически осмотрены лично. На все семьи заполнялась стандартная медицинская карта. При составлении родословных использована общепринятая символика (Н. И. Бочков, 1982). Наряду с генеалогическим анализом в семьях проведено детальное исследование неврологического статуса. Из лабораторных и инструментальных методов исследования использовались: электромиография, электрокардиография, эхокардиография.

Таблица 1

## Объем материала и его характеристика.

Характер обследования (исследования)	Общее число обследованных					
	мужчин		женщин		всего	
Эпидемиологический	1.173.000		1.126.000		2.299.000	
Клинический	132		93		225	
Молекулярно- генетический	больные	здоровые родственники (больных)	больные	здоровые родственники (больных)	больные	здоровые родственники (больных)
	25	34	—	47	25	81

81



исследование сывороточной активности креатинкиназы (КК), фосфатазы, определение креатина и креатинина в крови и моче, мочевой кислоты, кальция, фосфора.

Для точной постановки диагноза МДД особое значение имеет проведение тщательной дифференциальной диагностики с различными фенотипами, и в первую очередь с "дженноподобной" миодистрофией, или так называемой "тяжелой аутосомно-рецессивной миодистрофией детского возраста" (Ben H'mida et al., 1992). С этой целью особое внимание при диагностике МДД членами уделялось следующим критериям: а) наличие типичной генеалогии, свидетельствующей об X-сцепленном характере наследования болезни; б) наличие типичной кардиомиопатии, чрезвычайно характерной для МДД (по данным клинического обследования, ЭКГ, ЭхоКГ, ФКГ); в) наличие у обследуемого лица больных сибсов с подтвержденным дефектом дистрофина.

Молекулярно-генетические исследования гена МДД были проведены у 25 больных и 81 родственника (родители и сибсы пробандов) из 23 семей. ДНК-исследования включали делеционный анализ гена дистрофина и анализ ДНК-полиморфных локусов в семьях больных. ДНК-диагностика осуществлялась нами на базе НИИ медицинской генетики Томского Научного Центра РАМН (директор, член-корр. РАМН профессор Пузырев В.П.) в лаборатории молекулярной генетики совместно с канд. биол. наук О.Н.Одиноквой. Генетико-эпидемиологическое исследование семей с МДД проведено на всей территории Таджикистана в соответствии с современным административно-территориальным делением республики (А.Кажаров, 1990). Распространение МДД по регионам республики представлено в табл. 2. Всего по республике было выявлено 170 больных МДД в 127 семьях или 3,4 на 100 тыс. населения.

Анализ показал, что в семьях, отягощенных МДД, 11% составили смешанные браки (таджики и узбеки), а в 89% случаев были отмечены браки между супругами одной национальности (66% - таджики, 14% - узбеки, 10% - русские, казахи, киргизы, или туркмены).

Указание на кровное родство родителей было в 26 семьях из 127. В 91 семье имелось по одному больному ребенку, в 26 по два больных, в 8 - трое детей больных МДД и в двух семьях - четверо

Таблица 2

Количество больных МДД различных стадий заболевания  
в зависимости от территориального распределения

Регионы (области, города)	Стадии заболевания			
	I	II	III	Всего
ГБАО	2	1	2	5
Кулябская	10	8	6	24
Курган – Тюбинская	16	13	9	38
Ленинабадская	8	10	5	23
г. Душанбе	13	12	6	31
Районы республиканского подчинения	17	19	13	49
ИТОГО	66	63	41	170

больных. Следует особо отметить, что нами были выявлены 6 случаев МДД у девочек, что по данным литературы представляет собой исключительную редкость (Emery, АЕН 1993); во всех случаях диагноз МДД у девочек подтверждался обнаружением у больных сиб в мужского пола делеций в гене дистрофина. Клиническая картина миопатии Дюшенна укладывалась в рамки классических списаний.

Средний возраст начала болезни у обследованных больных составил 6-7 лет. В многолетних семьях было трудно точно установить начало заболевания, так как его "замечали" окружающие лишь после того, как наступала значительная декомпенсация двигательной функции. Однако при детальном опросе удалось выявить, что большинство (72%) больных детей ходить начали поздно - к трем годам, часто падали, что расценивалось родителями как общая слабость.

Основная масса выявленных нами больных детей - это лица коренной национальности из многолетних семей, где степень внимания к детям снижена. Возможно, поэтому наши данные отличаются от литературных (Т. А. Дроздина, 1970; Л. Г. Калмыкова, 1976; Н. А. Ильина, 1982), где фиксируется более раннее начало заболевания. "Утинная" походка отмечена у 100% больных, обусловлена слабостью мышц тазового пояса. Дети часто спотыкались, падали и получали переломы - лобной, лучевых костей в типичном месте, малоберцовой кости (8%), иногда повторно, гипертрофия мышц была заметна у 9% детей. В остальных случаях она была "компенсирована" гиперстенической конституцией и хорошо развитой подкожно-жировой клетчаткой или ожирением. Проявление гиперлордоза в поясничном отделе выявили у 95% детей. Он сочетался с отвислым животом у 68% больных и "лягушачьим" животом у 13% больных МДД. Особенно отчетливо у 87% больных слабость мышц тазового пояса и бедер проявилась к 6-7 годам. Нами было отмечено, что несмотря на гипотрофию, гипотонию и снижение силы мышц склонность к образованию грыж у детей с МДД минимальная. Из всех больных только у одного отмечена пупочная грыжа. Сила мышц снижалась к 6-7 годам до 3-4 баллов, портфель первоклассника и ступеньки лестницы в школе становились большим препятствием для посещения школы. В этом возрасте сила мышц плечевого пояса еще отчетливо сохранялась на уровне 4 баллов, но уже на-

мечались "крыловидные" лопатки, отставание лопаток от грудной клетки, симптомы свободных надплечий. При падении дети вставали с пола без посторонней помощи по "лестничному" типу. Псевдогипертрофия икроножных мышц отмечены в 87% случаев, мышц предплечий - 52%, половых органов - 2%, губ - 11%, дельтовидной мышцы - 7%, языка - 9%. Сила дистальных отделов ног и рук сохранялась относительно долго от 3 до 8 лет (73% больных). По мере прогрессирования процесса к 8-9 годам у 38% детей выявлена тугоподвижность и в локтевых суставах. Ахиллов рефлекс не удавалось вызвать к 4 годам у 88% детей, потеря коленного рефлекса отмечена с 7-летнего возраста у 67% больных. Сухожильные рефлексы с рук начинали снижаться и исчезать к 9-10 годам в 73% случаев. Психические нарушения, выявлены у 76 детей (43,3%). Наши наблюдения показывают, что чем раньше начались проявления МДД, тем тяжелее протекали нарушения психики.

Многие авторы (Н. А. Ильина, 1982; К. И. Теблов, 1994) отмечают при МДД поражение мышцы сердца, желудка, кишечника. Всем больным при нашем наблюдении проведено ЭКГ, 6 больным Эхо КГ и ФКГ исследование в динамике. У 28% больных найдено изменение на ЭКГ: у 22 детей частичная блокада ножек пучка Гисса, в 10 случаях нарушение внутрипредсердной проводимости, у 6 детей обнаружены изменения в виде нарушения ритма (аритмия, тахикардия, брадикардия), у 4-х зарегистрирована атриовентрикулярная блокада I степени (PQ - 0,19" и 0,18"), в случаях отмечались изменения в виде узлового ритма, а у 3 больных выявлена сглаженность зубца Т и удлинение электрической систолы желудочков. Данные изменения на ЭКГ свидетельствуют о вовлечении в патологический процесс при МДД миокарда. Эхо КГ и ФКГ свидетельствует о гипертрофии миокарда у 18% больных.

Одной из наиболее характерных особенностей нашей выборки больных явилось большое количество болящих (68%), имевших те или иные дизрафические проявления. Эти признаки включали в себя следующие изменения: гипертелоризм, эпикант, макро- или микроотии, прогнатизм, деформации ушных раковин - приплюснутость, неправильный завиток, противозавиток, деформации черепа (башенный, высокое

небо, брахидактилия), изменения позвоночника и грудной клетки, наблюдаемые у больных МД. Нами у каждого третьего больного отмечена деформация зубов.

По нашему мнению, столь высокая частота дизрафических стигм и аномалий развития в исследованной популяции может быть объяснена, во всяком случае частично, высоким коэффициентом имбридинга и, следовательно, неблагоприятным генетическим фоном, на котором происходила манифестация заболевания. Рентгенологическое исследование у 32 больных МД выявило атрофию бедренных и большеберцовых костей, сужение диафизов трубчатых костей, обусловленные рассасыванием коркового слоя и сужением костно-мозгового канала, замедление оссификации, симптом "пера".

У всех больных имелся высокий риск развития лекарственной аллергии, так как они многократно в течение ряда лет получали медикаментозную терапию, включающую в себя комплекс витаминов, биогенные стимуляторы, гормоны, антихолинэстеразные препараты и дробное переливание крови. Исходя из этого, в процессе сбора анамнеза мы особое внимание придавали учету индивидуальных аллергических реакций. Выяснилось наличие рачее перенесенных и широко распространенных заболеваний типа нейродермита, поллиноза, аллергического ринита, сезонного конъюнктивита, поствакцинальной аллергии, бронхиальной астмы, астматического бронхита, пищевой и лекарственной аллергии, крапивницы, отека Квинке и токсикоаллергических осложнений, детских инфекций. Все вышеперечисленное в сочетании с катарическим наблюдением в течение многих лет, динамическим контролем у 124 больных с МД (определение содержания разных популяций лимфоцитов в периферической крови, абсолютное и относительное содержание Т- и В-лимфоцитов, уровень иммуноглобулинов класса А, М, G, белка и белковых фракций в сыворотке крови) указывает на снижение аллергологической реактивности больных миопатией Юшенна. Следует отметить, однако, что за весь период наблюдения за указанными больными нам не удалось выявить ни одного случая аллергических реакций. Это может указывать на то, что измененная мышечная ткань теряет, по видимому, способность матрицы, на которой происходит соединение антигена с клеточным. Либо в

процессе формирования аллергических реакций у больных МДД уменьшение количества реагентов снижает вероятность возникновения аллергии. У 12-ти больных (8%) отмечены эндокринологические изменения - общее ожирение, синдром Иценко-Кушинга и другие. По способности обслуживать себя выделены три группы больных. Больных с I стадией - 69 чел., II стадией - 64, III стадией - 42 человека.

Таким образом, проведенное клиническое исследование больных в семьях с МДД позволило нам выявить некоторые особенности клинического проявления и течения заболевания в популяции Таджикистана. К ним относятся: позднее начало болезни в 6-7 лет; ранняя декомпенсация с ранним развитием контрактур в плечевых суставах, затем голеностопных суставах (указанная особенность в значительной степени может быть обусловлена традицией сидеть на полу); грубые деформации грудной клетки; достаточно высокая частота встречаемости малых аномалий; благоприятное медленное течение заболевания у девочек, выявленных в семьях, больных МДД.

#### Молекулярно-генетический анализ

Молекулярно-генетическое исследование больных с МДД и членов их семей проведено у 25 пробандов из 23 семей. Исследован делеция в гене дистрофина методом множественной полимеразной реакции амплификации промоторной области гена и отдельных экзонов гена дистрофина: 3, 6, 8, 13, 17, 19, 32, 43, 44, 45, 47, 48, 50, 52 и 60 экзонов.

Делеция исследуемого региона гена определялась по отсутствию соответствующего продукта амплификации на электрофореграмме. Например, на представленном рисунке (рис. 1) видно отсутствие фрагментов ДНК, соответствующих экзонам 17 и 19 (дорожка 4), экзону 45 (дорожки 2 и 5) экзону 44 (дорожки 3 и 6). Делеция какого-либо из исследуемых регионов гена были определены нами у 13 больных из 13 семей, что составляет 48% исследованных семей. Как видно из таблицы 3, делеции определялись в различных участках и были достаточно полиморфными.

Анализ частоты встречаемости делеций отдельных участков гена не выявило делеций промоторной области 3, 6, 52 и 60 экзонов.

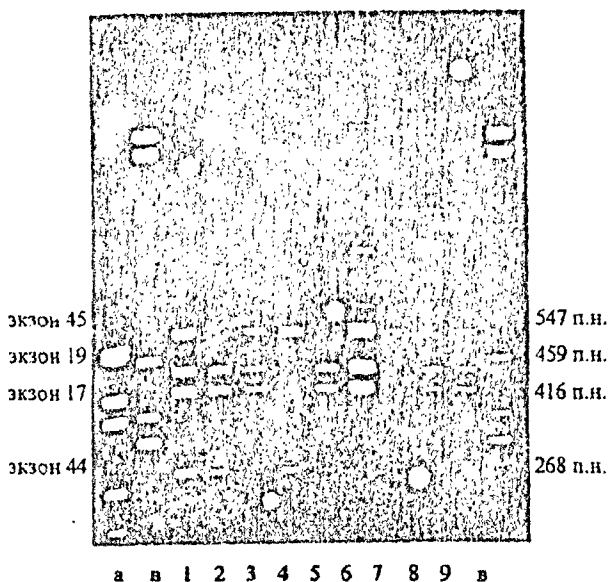


Рис.1 Делеционный анализ у больных МДД: амплификация 17, 19, 44, 45 экзонов гена дистрофина методом множественной ПЦР.

а - рUC 18/Msp I, в рBR 322/Taq I,

дорожки 1 - 9 - ДНК больных МДД:

1 - ДНК больного 11-1,

2 - ДНК больного 7-1: отсутствует экзон 45,

3 - ДНК больного 10-1: отсутствует экзон 44,

4 - ДНК больного 2-2: делеция экзонов 17 и 19,

5 - ДНК больного 22-1: делеция экзона 45,

6 - ДНК больного 27-1: делеция экзона 44,

7, 8, 9 - ДНК больных 3-3, 6-5, 9-1.

Результаты определения методом ПЦР делеций промоторной области и отдельных экзонов гена дистрофина у больных МДД

Пробанды	Pm	Экзоны гена														
		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	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
% (MDD)*	-	-	-	4	4	4	4	4	4	9	9	22	22	35	-	-
% (delMDD)**	-	-	-	9	9	9	9	9	9	18	18	45	45	73	-	-

Примечание:

- + - наличие исследуемого фрагмента гена дистрофина;
- - делеция фрагмента ДНК;
- \* - % выявление делеций фрагмента у обследованных больных МДД (25 больных из 23 семей);
- \*\* - встречаемость делеций фрагмента среди больных с выявленными делециями гена.



Делеции экзонов 8, 13, 17, 19, 32, 43 выявлены у 4% больных, делеции экзонов 44, 45 - у 9% больных. Наиболее часто определены делеции 47, 48 экзонов - в 22% случаев МДД, а делеция экзона 50 - в 35% случаев болезни. Изучение размера и расположения ДНК-нарушений у таджикских больных показывает преобладание делеций в дистальной области дистрофина. Отсутствие ядра экзонов в проксимальной части гена зафиксировано только у двух пробандов из одной семьи; у обоих определена достаточно протяженная делеция, охватывающая не менее 12 экзонов гена. У одного больного выявлен крупный дефект гена затрагивающий не менее 12 экзонов гена. Остальные выявленные делеции (82%) были меньше по размерам - от одного до нескольких экзонов. Делеции всего гена или большей его части не были выявлены ни в одном случае.

В таджикской популяции можно предположить некоторые особенности молекулярных нарушений структуры гена дистрофина при МДД. Так, при определении границ молекулярного дефекта была обнаружена "горячая точка" гена дистрофина: в 73% случаев всех выявленных делеций одна из границ разрыва ДНК (дистальная) находилась между 50 и 52 экзонами гена, что видимо, отражает некоторые популяционные отличия таджикской популяции от описанных в литературе. В Таджикистане не наблюдается характерное для многих популяций одного из максимумов делеций в 3 регионе гена дистрофина (в первых двадцати экзонах гена). Для 91 неродственных пробандов с определяемыми делециями кодирующей части гена дефекты ДНК обнаружены нами в районе экзонов 44-50.

В Таджикистане дефекты в гене дистрофина при мышечной дистрофии Дюшенна выявлены в 52% обследованных семей. Такая эффективность установления молекулярного дефекта считается довольно высокой в мировой практике, что позволяет осуществлять достаточно корректную и точную диагностику, в том числе пренатальную в семье больных с уже детектированными дефектами гена. Прямые методы детекции мутаций оказались неинформативными в 48% семей.

Таким образом, высокий процент дефектов включающих 50 экзон, не встретившийся в литературе для других популяций позволяет предположить носительство данного варианта патологического гена у

большой доли женщин родственных больным МДЦ в Таджикистане (в 35% семей путем прямой детекции наличия или отсутствия данного фрагмента гена в хромосомах).

Следующий этап молекулярных исследований - это поиск информативных ДНК маркеров в семье. Мы исследовали в работе полиморфизм по двум локусам системы rERT: 87-8/Tag и rERT 87-15/Bam HI.

Аmplификацией фрагментов ДНК из региона 87-8/Tag I гена дистрофина с последующей рестрикцией ферментом Taq I выявляются два варианта ДНК-фрагментов - 145 п.н. или 74 п.н. +71 п.н., в зависимости от отсутствия или наличия в ДНК сайта для рестриктазы Taq I. Амплификацией ДНК из региона rERT 87-15/Bam HI с последующей рестрикцией ферментом Bam HI выявляются также два варианта ДНК-фрагментов-216 п.н. или 166 п.н. +50 п.н. в зависимости от отсутствия или наличия в ДНК сайта для рестриктазы Bam HI.

Нами был проведен анализ ПДРФ по полиморфным системам rERT 87 в 23 семьях, имеющих больных МДЦ детей. При этом 16 семей оказались информативными (матери пробандов были гетерозиготны) хотя бы по одному локусу, 5 семей - неинформативными; обнаружены 2 случая рекомбинаций в гене дистрофина. Дополнительно к этому в двух семьях у больных выявлена делеция данной области гена, о чем было уже упомянуто выше. Пример такой косвенной ДНК-диагностики в семье с МДЦ представлен на рис. 2.

Непосредственное определение нарушений в гене может расширить возможности и точность медико-генетического консультирования семей таджикских больных. Этот путь имеет ряд преимуществ по сравнению с анализом сцепления с внутригенными и фланкирующими ДНК-маркерами: 1) становится возможной диагностика (в том числе и пренатальная) при спорадических случаях; 2) для пренатальной диагностики достаточно применения только 1 маркера (делетированного у больных в семье), причем риском рекомбинации можно пренебречь; 3) не нужно привлекать трудоемкий анализ сцепления.

Что касается пренатальной диагностики, то она возможна во всех семьях с делециями и связана с детекцией у плода тех же фрагментов ДНК, которые отсутствовали у больного. С развитием и совершенствованием методов молекулярно-генетического анализа

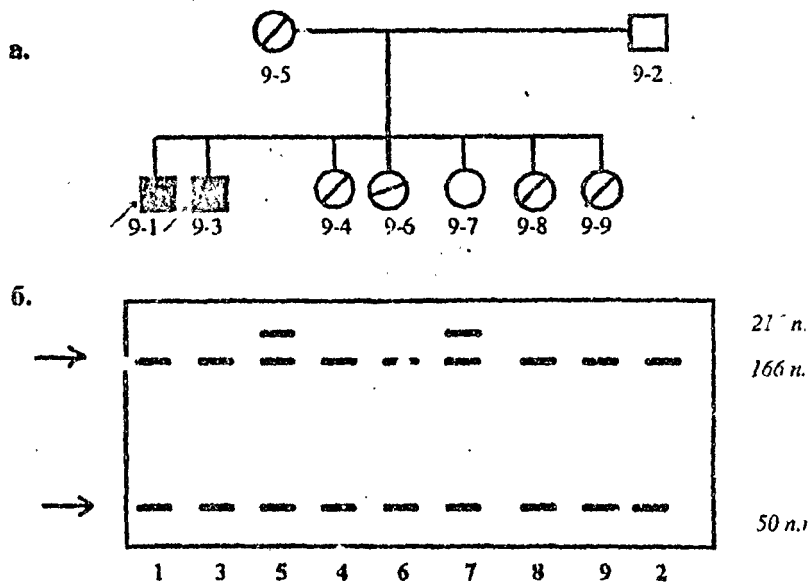


Рис. 2. Анализ ПДРФ в локусе pERT87-15/Var NI в семье с двумя больными МДД.

а - родословная семьи;

б - схема электрофореграммы анализа ПДРФ.

возможности пренатальной диагностики в системе мер профилактики будут увеличиваться. При этом повышение значимости профилактических медико-генетических мероприятий зависит и от уровня информированности врачей существующих служб здравоохранения и населения о наследственных болезнях и возможностях их предотвращения. Следует отметить, что выше описанный метод ДНК-диагностики в силу своей трудоемкости, многоэтапности процесса, использования дорогих химических реактивов, изотопов и ферментов диктует необходимость создания специального, хорошо оснащенного центра молекулярной диагностики наследственных болезней. Учитывая высокую экономическую и социальную эффективность молекулярно-генетических методов диагностики и профилактики этой патологии, следует по-видимому, ставить вопрос о создании такого центра в Таджикистане в системе специализированной медикогенетической службы республики. (Рис. 3).

Она создается Минздравом республики Таджикистан. Основным видом деятельности учреждений медико-генетического центра (МГС) является профилактика врожденной и наследственной патологии путем организации и проведения ретро- и проспективного медико-генетического консультирования, пренатальной диагностики, прееклинической диагностики и новорожденных наследственных болезней, направление больных на лечение и диспансерное наблюдение семей с наследственной патологией.

#### Структура и задачи медико-генетической службы

В задачи районного (городского) уровня входит выявление семей,отягощенных наследственной и другой патологией, их учет и направление в региональное (областное) медико-генетическое учреждение, диспансерное наблюдение за лицами с выявленной патологией, распространение медико-генетических знаний среди врачей, среднего медперсонала и населения района. Совместно с Таджикским медицинским университетом им. Абу али ибн Сино с использованием республиканских специализированных клиник организация республиканского медико-генетического центра (МГЦ). МГЦ в задачи которого входит:

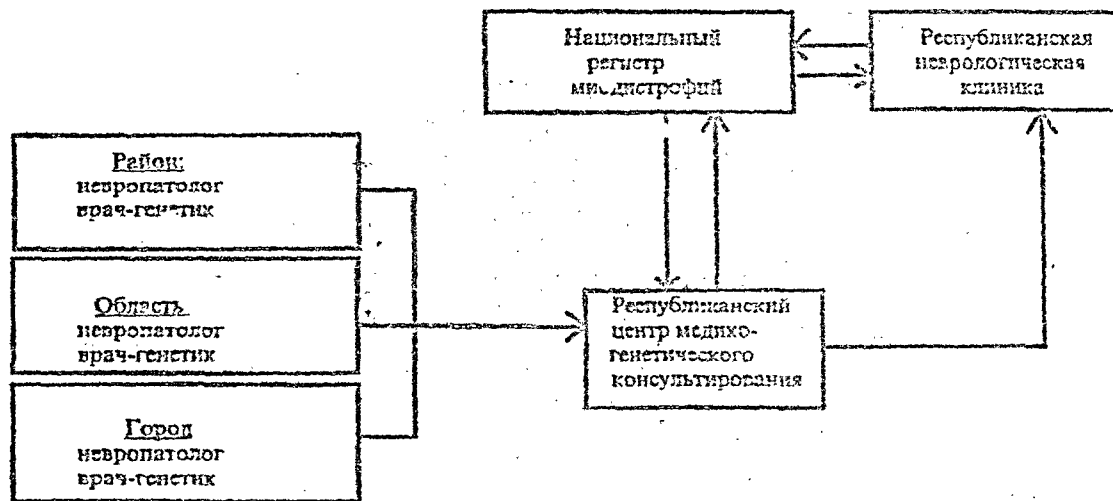


Рис. 3. Схема взаимодействия лечебно-диагностических учреждений республики с медико-генетическим центром и национальным регистром миодistroфий.

консультирование сложных случаев патологии, подтверждающая цитогенетическая, биохимическая и молекулярно-генетическая диагностика сложных и редких случаев наследственных болезней; разработка, апробация и внедрение новых методов диагностики, лечения и реабилитации, подготовка и повышение квалификации специалистов медико-генетических учреждений путем организации стажировки на рабочем месте; ведение национального регистра семей с наследственной патологией.

МГС функционирует как составная часть системы лечебно-профилактических учреждений практического здравоохранения, осуществляет свои мероприятия в координации с акушерской, педиатрической, неврологической и другими службами. Принцип инфраструктуры МГС - территориальный, основанный на создании и развитии материальных, кадровых и финансовых ресурсов здравоохранения для обеспечения гарантируемых видов медико-генетической помощи семьям,отягощенным наследственной и врожденной патологией: медико-генетическое консультирование пренатальная диагностика, скрининг новорожденных на поддающиеся коррекции наследственные болезни, социально-медицинская реабилитация наследственных больных. МГС охватывает районный, городской, региональный (областной и др.) и республиканский центр, обеспечивая максимальное приближение к месту жительства обслуживаемых контингентов населения, оказание специализированной помощи.

## В ы в о д ы

1. Впервые получены оценки распространенности МДД в Республике Таджикистан. Рассчитанная средняя частота МДД составила 3,4 на 100 тыс. населения.
2. Клиническое исследование в семьях больных с МДД позволило уточнить у больных некоторые особенности клинического течения заболевания, характерные для исследованной популяции: позднее начало заболевания в 6-7 лет; ранняя декомпенсация с развитием контрактур в крупных суставах; высокая частота дизрафических

- стигм и аномалий развития; высокий риск лекарственной аллергии. благоприятное течение заболевания у девочек.
3. В результате молекулярно-генетического анализа в выборке больных с МДД из популяции Таджикистана делеции гена дистрофина установлены в 52% семей больных с использованием мультиплексной ДНК-амплификации промоторной области отдельных экзонов гена дистрофина (3, 6, 8, 13, 17, 19, 43, 44, 45, 47, 48, 50, 52, 60 экзонов) и локусов рЕРТ-87-15/Ва Н1.
  4. Исследование спектра делеций гена у больных МДД выявило значительный полиморфизм мутаций, с преобладанием дефектов в дистальной области гена (83%). Часто определялись делеции экзонов 47, 48 - в 22% случаев, делеция экзона 50 - в 35% случаев болезни (или у 73% больных с идентифицированными делециями). Таким образом, наиболее диагностически значимой является пара олигонуклеотидных праймеров для определения экзона 50 гена дистрофина. Это обосновывает первоочередную целесообразность и важность анализа данного региона гена при дальнейшей диагностике МДД в таджикском регионе.
  5. На основании полученных нами результатов предложена модель оказания медико-генетической помощи населению Таджикистана.

По теме диссертации опубликованы следующие работы:

1. Генетико-демографическая характеристика сельской популяции юга Таджикистана      Генетика человека и патология. материалы 2 итог. конференции НИИ мед. генетики ТНЦ РАМН, Томск, ТГУ, 1992. - С. 6-8.      Сопавторы: Дьясенко Е. П., Раджабалиев Ш., Иванова О. Ф., Кучер А. Н.

2. Медико-генетическая характеристика наследственных болезней Кулябской области Таджикистана

Генетика человека и патология. Материалы 2 итог. конф. НИИ мед. генетики ТНЦ РАМН, Томск, ТГУ, 1992. - С. 37-38.

Соавторы: Салюкова О. А., Пузырева О. А., Назаренко Л. П., Раджабалиев Ш. Ф., Хакназаров А. Х., Пузырев В. П.
3. Популяционно-генетическая характеристика сельской популяции юга Таджикистана

Генетика, 1993 т. 29, № 8. - С. 1375-1381.

Соавторы: Дьяченко Е. П., 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.

Соавторы: Раджабалиев Ш. Ф., Дьяченко Е. П., Пузырев В. П., Кучер А. Н., Иванова О. Ф.
5. Изучение генетических факторов в формировании уровня здоровья сельского населения юга Таджикистана

Материалы годичной 42-й научн. конференции Госмедуниверситета им. Абуали ибн Сино "Актуальные вопросы профилактики болезней человека", Душанбе, 1994. - С. 139-140.

Соавторы: Кучер А. Н., Пузырев В. П.
6. Наследственная патология в Кулябской области Таджикистана

Материалы годичной 42-й научн. конференции Госмедуниверситета им. Абуали

Соавторы: Пузырев В. П., Пузырева О. А., Назаренко Л. П.,



- ибн Сино "Актуальные вопросы профилактики болезней человека", Душанбе, 1994. - С. 147-148. Ахмедов А. А.
7. Эпидемиология наследственных болезней в Кулябской области Таджикистана (предварительное сообщение) Здоровоохранение Таджикистана, 1993, № 6. - С. 42-44 Соавторы: Раджабалиев Ш. Ф., Салюкова О. А., Наззренко Л. П., Пузырева О. А.
8. Эпидемиология мнодистрахий Эрба-Рота в Таджикистане Здоровоохранение Таджикистана, 1993, № 4. - С. 33-37. Соавторы: Раджабалиев Ш. Ф., Хамушанов М. М.
9. Генетическое консультирование на основе исследования гена дистрофина. Актуальные вопросы региональной патологии и оптимизации учебного процесса. Душанбе, 1995. - С. 72. Соавторы: Пузырев В. П., Раджабалиев Ш. Ф.