

Опыт молекулярно-генетического анализа при наследственных болезнях нервной системы в Республике Таджикистан

*Н.Ю. Абрамычева, Р.А. Рахмонов,
Т.В. Мадаминова, М.С. Степанова*

В статье представлены результаты молекулярно-генетического анализа семей с наследственными болезнями нервной системы, зарегистрированными на территории Гиссарского района Таджикистана. Впервые в указанной популяции идентифицированы на ДНК-уровне следующие молекулярные формы заболеваний: спиноцереbellарная атаксия 2-го типа (ген *ATXN2*), болезнь Фридрейха (ген *FXN*), наследственная спастическая параплегия 4-го типа (ген *SPAST*). Полученный опыт клинико-генетических сопоставлений и дальнейшее расширение таких исследований должны стать основой для совершенствования системы медико-генетического консультирования семей с наследственными болезнями нервной системы и профилактики наследственной неврологической патологии в Республике Таджикистан.

Ключевые слова: наследственные болезни нервной системы, молекулярно-генетический анализ, мутации, ДНК-диагностика, Республика Таджикистан.

Чрезвычайно сложной проблемой современной клинической неврологии, имеющей несомненную социальную значимость, остаются наследственные болезни нервной системы (НБНС) [1]. Это связано не только с их тяжелым течением, нередко фатальным исходом и отсутствием патогенетических методов лечения, но и с выраженным клинико-генетическим полиморфизмом основных групп НБНС. Так, для болезни Паркинсона в настоящее время известно уже более 20 самостоятельных генетических локусов, сходная ситуация характерна также для наследственных дистоний, спиноцереbellарных атаксий (СЦА) и других наследственных заболеваний [2–8].

Важно отметить, что, несмотря на относительную редкость отдельных нозологических форм НБНС, их общая распространенность довольно высокая. Об этом свидетельствуют результаты многочисленных популяционных исследований [9–12]. При этом в конкретных популяциях может наблюдаться особенно высокая концентрация случаев определенных форм патологии: ярким примером является чрезвычайно высокая частота СЦА 1-го типа (СЦА1) в Якутии [13]. Таким образом, большое значение имеет оценка распространенности НБНС в различных популяциях мира,

а также установление частот соответствующих мутаций в генах, вызывающих развитие изучаемых заболеваний. Эти данные лежат в основе мероприятий, направленных на разработку мер профилактики НБНС, включая пренатальную ДНК-диагностику, медико-генетическое консультирование и диспансерное наблюдение за семьями,отягощенными наследственной патологией [1, 10, 11].

В Республике Таджикистан отсутствуют современные эпидемиологические сведения о НБНС. Проведенные ранее эпидемиологические исследования в отдельных регионах страны носили ограниченный характер и были посвящены лишь определенным нозологическим формам НБНС. Так, на территории Исфаринского района республики была выявлена форма аутосомно-доминантного эссенциального тремора, сцепленная с хромосомой 3q13 – локус ЕТМ1 [12, 14]. Имеются также работы, посвященные эпидемиологическим аспектам НБНС в отдельных регионах Республики Таджикистан [12, 15].

Целью исследования явилось обобщение первого опыта молекулярно-генетической диагностики НБНС в семьях, проживающих на территории Гиссарского района Таджикистана. Работа проводилась в рамках проекта по изучению НБНС, осуществляемого под эгидой Международной ассоциации организаций в области неврологии и нейронаук.

Материал и методы исследования

Исследование проводилось на кафедре неврологии с основами медицинской генетики Таджикского государственного медицинского университета им. Абуали ибни Сино и ДНК-лаборатории V неврологического (нейрогенетического) отделения ФГБНУ “Научный центр неврологии”. Были исследованы образцы ДНК большой группы пациентов с различными формами НБНС, проживающих на территории

Наталья Юрьевна Абрамычева – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. V неврологического отделения ФГБНУ “Научный центр неврологии”, Москва.

Рахматулло Азизович Рахмонов – профессор, зав. кафедрой неврологии Таджикского государственного медицинского университета им. Абуали ибни Сино, Душанбе.

Тахмина Ворисовна Мадаминова – аспирант кафедры неврологии Таджикского государственного медицинского университета им. Абуали ибни Сино, Душанбе.

Мария Сергеевна Степанова – канд. биол. наук, науч. сотр. V неврологического отделения ФГБНУ “Научный центр неврологии”, Москва.

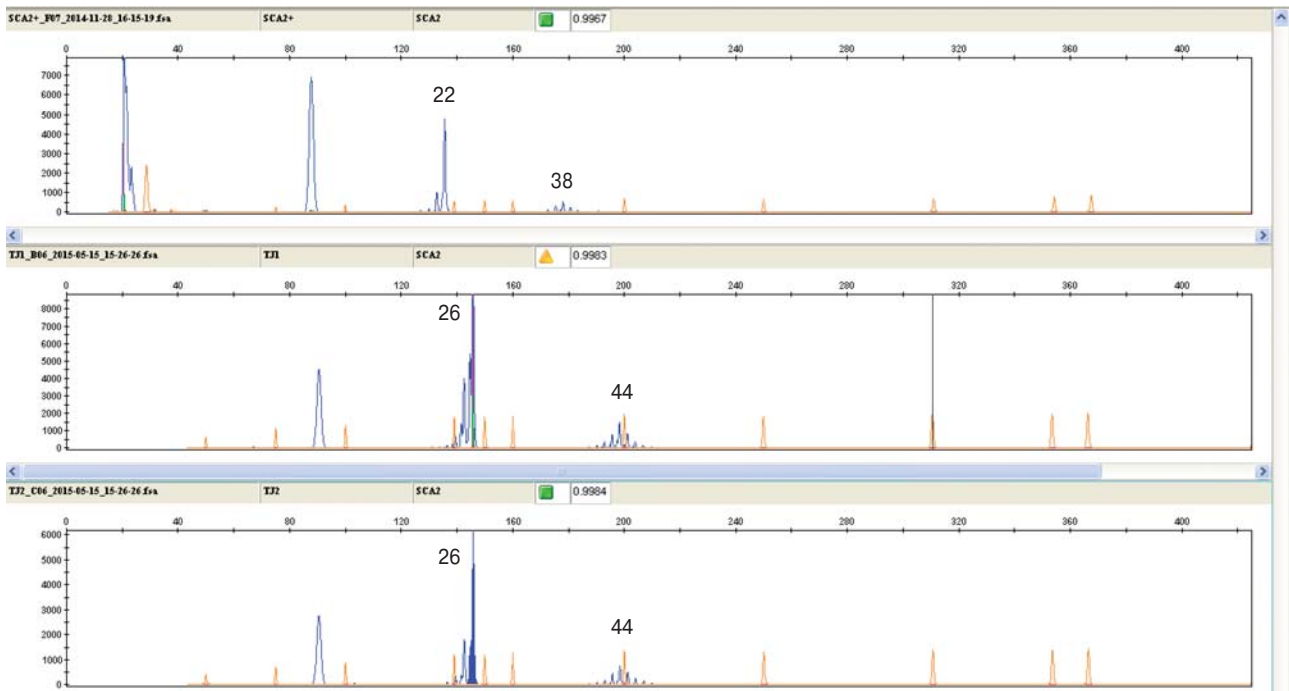


Рис. 1. Результат фрагментного анализа гена *ATXN2* (программное обеспечение GeneMapper). На верхней электрофореграмме приведен положительный контроль: гетерозиготное носительство патологического аллеля с числом копий CAG-повторов, равным 38 (при норме <30 повторов), нормальный аллель содержит 22 повтора. На средней и нижней электрофореграммах представлен анализ образцов ДНК пациентов Р.Ш. и Г.З.: в обоих случаях выявлено гетерозиготное носительство мутантного аллеля с числом копий 44 (нормальный аллель содержит 26 повторов).

Гиссарского района Республики Таджикистан и вошедших в ведущий в этом регионе регистр НБНС [15]. Клиническая картина в изученных случаях соответствовала СЦА (с аутомно-доминантным или аутомно-рецессивным наследованием) или спастическим параплегиям (СПП).

Молекулярно-генетический анализ включал, в зависимости от особенностей клинического фенотипа и характера наследования болезни, поиск мутаций в генах аутомно-доминантных СЦА1, СЦА2, СЦА3 и СЦА6 (*ATXN1*, *ATXN2*, *ATXN3*, *CACNL1A4* соответственно), болезни Фридрейха (*FXN*), а также наиболее частой формы наследственной СПП – СПП 4-го типа (СПП4; ген *SPAST*).

Мутационный скрининг включал: 1) фрагментный анализ ампликонов – для заболеваний, характеризующихся экспансией тандемных тринуклеотидных повторов [16]; 2) прямое секвенирование кодирующей области гена *SPAST*.

Результаты и обсуждение

Те или иные мутации в изучаемых генах были выявлены в четырех обследованных семьях – одной семье с аутомно-доминантной СЦА, двух семьях с аутомно-рецессивной СЦА и одной семье с наследственной (аутомно-доминантной) СПП.

В семье с аутомно-доминантной СЦА у пробанда и ее дяди была выявлена типичная тринуклеотидная мутация (экспансия CAG-повторов) в гене *ATXN2* (рис. 1). Это позволяет на молекулярном уровне классифицировать выявлен-

ное заболевание как **СЦА2**. Приводим краткие выписки из истории болезни.

Семья Р.–Г.

Пациентка Р.Ш., 1987 г.р., жалобы на неустойчивость и шаткость походки, изменение речи, почерка, дрожание рук и головы, слабость в ногах, головокружение. Считает себя больной примерно с 22 лет, заболевание началось с неустойчивости при ходьбе и постепенно прогрессирует. Тем же заболеванием страдала мать, которая умерла от сердечно-сосудистой патологии (инфаркт миокарда) в возрасте 56 лет, а также двое родственников по материнской линии – дядя (см. ниже) и бабушка. Неврологический статус: конвергенция сохранна, нистагма нет. Речь скандированная. Сухожильные рефлексы с рук снижены, с ног – не определяются; мышечный тонус в руках и ногах снижен. Патологических знаков нет. Координаторные пробы (пальце-носовая, пальце-пальцевая, пяточно-коленная) выполняет с интенцией. Отмечается тремор в руках (постуральный, интенционный), тремор головы. В пробе Ромберга резко неустойчива, отклоняется назад. Походка шаткая, с широко расставленными ногами. Чувствительных нарушений не выявлено. Функция тазовых органов не нарушена. Когнитивные функции сохранны. Компьютерная томография (КТ) головного мозга: признаки атрофии мозжечка.

Клинический диагноз: аутомно-доминантная СЦА.

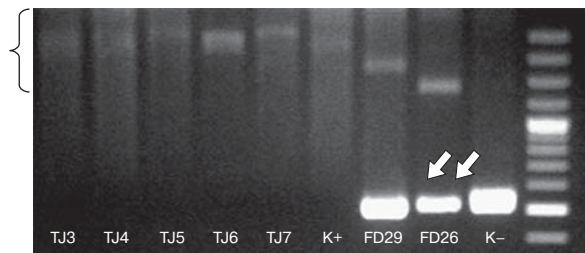


Рис. 2. Результат анализа гена *FXN* в агарозном геле. Нормальные аллели указаны стрелками, область мутантных аллелей обозначена фигурной скобкой. Дорожка TJ3 – пациентка А.Х., дорожка TJ4 – пациент А.А., дорожка TJ5 – пациентка С.М., дорожка TJ6 – пациент С.Мр., дорожка TJ7 – пациент С.Мх., в дорожках К+ и К– исследованы мутантный и нормальный контроли соответственно, дорожки FD29 и FD26 – контроли с гетерозиготностью по экспансии повторов в гене *FXN*. Крайняя правая дорожка – маркер размера (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder).

Результат исследования гена *ATXN2* методом фрагментного анализа: выявлено гетерозиготное носительство патогенной мутации по типу экспансии CAG-повторов (нормальный аллель содержит 26 повторов, мутантный – 44 повтора, см. рис. 1).

Пациент Г.З., дядя вышеописанной пациентки, 1954 г.р. Жалобы те же, но более выраженные. Возраст начала заболевания – около 35 лет. В неврологическом статусе отмечаются сходные симптомы, однако на момент осмотра самостоятельно передвигаться больной уже неспособен, ходит только с поддержкой. Резко выражены тремор рук и дизартрия: речь невнятная, трудноразличимая. Компьютерная томография головного мозга не проводилась. По данным фрагментного анализа выявлена идентичная мутация с тем же количеством повторов в обоих аллелях гена *ATXN2*.

Таким образом, фенотип у обоих пациентов вполне соответствовал описанной клинической картине СЦА2: для этой формы СЦА, в частности, типично сочетание прогрессирующих нарушений координации с угнетением сухожильных рефлексов [16], что и имело место у описанных выше больных родственников.

В двух обследованных нами семьях с аутосомно-рецессивной СЦА у пробандов и их больных сибсов выявлена значительная экспансия tandemных GAA-повторов в гене *FXN* в гомозиготном состоянии (рис. 2). Такой тип молекулярного дефекта соответствует **болезни Фридрейха**. Приводим краткие выписки из истории болезни.

Семья А.

Пациентка А.Х., 1993 г.р. Жалобы на шаткость при ходьбе, невозможность самостоятельно передвигаться, слабость и дрожание в руках и ногах, изменение речи и почерка. Болеет с 12 лет. Брак родителей родственный (двоюродные сибсы); в семье те же симптомы, но менее выраженные, имеются у младшего брата (см. ниже). Неврологический статус: нистагма нет, речь дизартричная. Парезов нет, сухожильные рефлексы и мышечный тонус в

руках и ногах резко снижены; патологических знаков нет. Координаторные пробы выполняет, но с трудом, при этом выявляется отчетливый интенционный тремор. В пробе Ромберга стоять не может, ходит только с поддержкой. Отмечаются гипотрофии дистальных отделов ног и деформация стоп (стопы Фридрейха – из-за изменений стоп больная была направлена с диагнозом “невральная амиотрофия”). Четких чувствительных нарушений нет. Электрокардиограмма (ЭКГ) без особенностей; КТ, магнитно-резонансная томография (МРТ) не проводились.

Клинический диагноз: болезнь (атаксия) Фридрейха.

Диагноз подтвержден при молекулярно-генетическом тестировании. Результат исследования гена *FXN* методом фрагментного анализа: выявлено гомозиготное носительство патогенной мутации по типу экспансии GAA-повторов (оба аллеля >700 повторов, дорожка TJ3 на рис. 2).

Пациент А.А., младший брат пробанда, 1998 г.р. Болеет в течение 2 лет. Заболевание началось со слабости ног. При осмотре: со стороны черепных нервов – без особенностей. Умеренное снижение сухожильных рефлексов и мышечного тонуса в конечностях. Отмечается умеренная гипотрофия нижних конечностей, стопы Фридрейха. Координаторные пробы выполняет удовлетворительно. В пробе Ромберга неустойчив, походка шаткая, на расставленных ногах. Чувствительных нарушений нет. Электрокардиограмма без особенностей; КТ, МРТ не проводились. При ДНК-диагностике идентифицирована гомозиготная мутация в гене *FXN*, число копий GAA-повторов в обоих аллелях >700 (дорожка TJ4 на рис. 2).

Семья С.

Пациентка С.М., 1987 г.р., жалуется на невозможность самостоятельно передвигаться и обслуживать себя, шаткость туловища, значительное дрожание рук и ног, головокружение. Заболевание началось в возрасте 14–15 лет с небольшого дрожания в руках и в дальнейшем неуклонно прогрессировало в довольно быстром темпе. Брак родителей родственный (двоюродные сибсы); в семье тем же заболеванием страдают два младших брата (см. ниже). Неврологический статус: нистагма нет, конвергенция в норме. Речь скандированная, “мозжечковая”. Сила мышц в руках и ногах снижена до 4 баллов; тонус мышц рук и ног низкий. Сухожильные рефлексы с рук резко снижены, с ног – не определяются. Патологических знаков нет. Координаторные пробы выполнить не может, грубо промахивается. В пробе Ромберга стоять не может из-за атаксии. Отмечается грубый тремор в руках, ногах, голове, усиливающийся при волнении и движениях. Больная полностью зависима от посторонних, в том числе в приеме пищи. Нарушений поверхностной и глубокой чувствительности нет. Отмечается деформация стоп по типу стопы Фридрейха. Электрокардиограмма без особенностей; МРТ, КТ не проводились.

Клинический диагноз: болезнь (атаксия) Фридрейха.

Диагноз подтвержден молекулярно-генетически. Результат исследования гена *FXN* методом фрагментного анализа: выявлено гомозиготное носительство патогенной мутации по типу экспансии GAA-повторов (оба аллеля >750 повторов, дорожка TJ5 на рис. 2).

Пациент С.Мр., младший брат пробанда, 1989 г.р. Возраст начала заболевания – около 15–16 лет. Симптомы заболевания идентичны таковым у сестры, но менее выраженные. Кроме того, в отличие от арефлексии ног у сестры у больного отмечается повышение сухожильных рефлексов в ногах. Способен себя обслуживать, ходит самостоятельно (с пошатыванием). На КТ головного мозга выявлена негрубая гипотрофия мозжечка. При ДНК-диагностике идентифицирована такая же гомозиготная мутация в гене *FXN*, число копий GAA-повторов в обоих аллелях >700 (дорожка TJ6 на рис. 2).

Пациент С.Мх., другой младший брат пробанда, 1996 г.р., у которого заболевание началось 2 года назад. Отмечается незначительно выраженный интенционный тремор рук при координаторных пробах, неустойчивость при ходьбе. В пробе Ромберга неустойчив, отклоняется назад. Сила мышц достаточная, сухожильные рефлексы с рук средней живости, с ног – повышены. Мышечный тонус слегка снижен. Патологических знаков нет. Деформации стоп нет. На КТ головного мозга: гипотрофия мозжечка. При ДНК-диагностике идентифицирована гомозиготная мутация в гене *FXN*, число копий GAA-повторов в обоих аллелях >750 (дорожка TJ7 на рис. 2).

В обследованных семьях с подтвержденной на молекулярном уровне болезнью Фридрейха имела место определенная вариабельность клинической картины. Так, наряду с классической сухожильной арефлексией, отмечавшейся у обоих пациентов в первой семье, у больных во второй семье наблюдалась как арефлексия (у пробанда), так и отчетливая пирамидная симптоматика с повышением рефлексов (у обоих братьев). Пирамидная симптоматика вплоть до спастической атаксии описана в ряде случаев при болезни Фридрейха, но подобная внутрисемейная вариабельность встречается весьма редко и объясняется, по-видимому, действием неуставленных генов-модификаторов. Особенно в описанных нами случаях явилось отсутствие значимых нарушений глубокой чувствительности и изменений на ЭКГ. Интересно, что в семье С. была выявлена определенная корреляция между тяжестью клинической картины и степенью экспансии GAA-повторов в мутантном гене: у старшей сестры (С.М.) более выраженная мутация с числом повторов >750 характеризовалась заметно более тяжелыми клиническими проявлениями; в то же время у ее брата (С.Мр.) при сопоставимой длительности болезни число повторов в гене оказалось меньшим (>700), что сопровождалось более мягким течением болезни.

Еще в одной обследованной нами семье, в которой у 9 родственников в четырех поколениях наблюдались

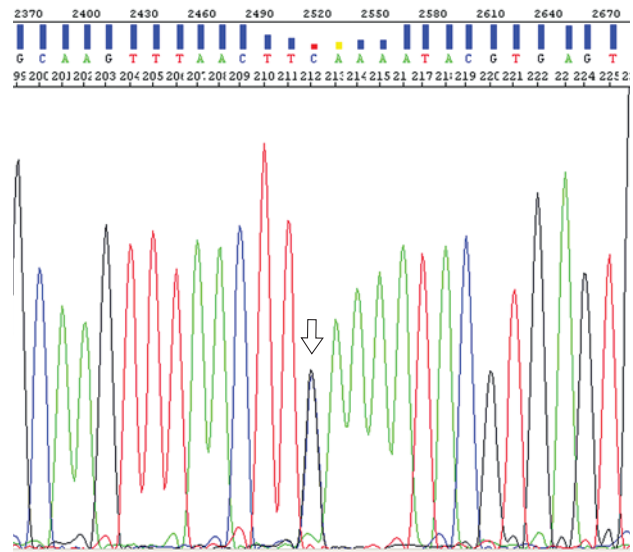


Рис. 3. Фрагмент секвенса гена *SPAST*. Стрелка указывает на область точковой мутации (TCA>TGA, p.Ser381X).

симптомы болезни Штрюмпелля (наследственной СПП), нами была выявлена гетерозиготная мутация в гене *SPAST* (рис. 3). Приводим выписку из истории болезни.

Семья К.

Пациент К.А., 1960 г.р. Жалобы на скованность в ногах, затруднения при ходьбе. Заболевание началось в возрасте 22–23 лет и очень медленно прогрессировало на протяжении десятилетий. В семье больны еще два его родных брата (остальные 5 сибсов здоровы), у одного из которых больны двое детей. Аналогичное заболевание зарегистрировано также у матери пробанда, у деда по линии матери, у младшего брата деда и у его сына. Неврологический статус: отмечается грубый нижний спастический парализ с гиперрефлексией, гипертонусом и стопными патологическими рефлексами (Бабинского, Оппенгейма, Гордона, Шефера), клonusы стоп и коленных чашечек. Руки сравнительно интактны. Походка спастическая, передвигается самостоятельно. Чувствительных нарушений нет. Функция тазовых органов не нарушена.

У двух больных братьев пробанда заболевание началось в том же возрасте и протекало совершенно стереотипно.

При скрининге кодирующей области гена *SPAST* (17 экзонов) в образце ДНК пробанда выявлена точковая нонсенс-мутация в 9-м экзоне (p.Ser381X, TCA>TGA). Мутация приводит к замене серина-381 на стоп-кодон. С учетом такого молекулярного дефекта, в данной семье с очевидным аутосомно-доминантным наследованием болезни может быть диагностирована **СПП4**.

Таким образом, проведенное нами исследование позволило впервые в популяции Республики Таджикистан идентифицировать на ДНК-уровне ряд молекулярных форм НБНС – СЦА2, болезнь Фридрейха, СПП4. Диагностированные заболевания относятся к числу наиболее частых

в нейрогенетике: так, например, болезнь Фридрейха считается самой часто встречающейся среди всех форм дегенеративных атаксий [16], а СПП4 является наиболее распространенным вариантом аутосомно-доминантной болезни Штрюмпелля (наследственной СПП). Отметим, что при всех диагностированных формах клиническая картина была довольно типичной, с незначительным внутрисемейным полиморфизмом и наличием клинико-генетических корреляций. Можно предположить, что наблюдавшиеся особенности фенотипов (например, отсутствие сенсорных расстройств и кардиомиопатии у пациентов с болезнью Фридрейха) являются характерными для таджикской популяции, что нуждается в дальнейшем изучении.

Полученные результаты, а также расширение молекулярно-генетических исследований в таджикской популяции должны стать научной основой для совершенствования системы медико-генетического консультирования семей с НБНС и профилактики наследственной неврологической патологии в Республике Таджикистан.

Список литературы

1. Наследственные болезни нервной системы: Руководство для врачей / Под ред. Ю.Е. Вельтищева, П.А. Темина. М., 1998.
2. Загоровская Т.Б. и др. // Журн. неврол. и психиатр. 2004. № 8. С. 66.
3. Иллариошкин С.Н. и др. // Журн. неврол. и психиатр. 2000. № 8. С. 60.
4. Иллариошкин С.Н. и др. // Неврол. журн. 2002. № 5. С. 47.
5. Иллариошкин С.Н., Иванова-Смоленская И.А. Дрожательные гиперкинезы: Руководство для врачей. М., 2011.
6. Illarioshkin S.N. et al. // J. Neurol. 1996. V. 243. P. 506.
7. Illarioshkin S.N. et al. // Eur. J. Neurol. 2007. V. 14. P. 413.
8. Periquet M. et al. // Am. J. Hum. Genet. 2001. V. 68. P. 617.
9. Ветрова Н.В. Генетическая эпидемиология моногенных болезней нервной системы у населения Ростовской области: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2012.
10. Гринберг Я.И. Комплексное медико- и популяционно-генетическое изучение населения Республики Башкортостан: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2009.
11. Проскокова Т.Н. Наследственные заболевания нервной системы в Хабаровском крае (популяционный, клинико-генеалогический, молекулярно-генетический анализ): Автореф. дис. ... докт. мед. наук. М., 2007.
12. Рахмонов Р.А. Наследственные болезни нервной системы в Таджикистане: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. М., 2004.
13. Платонов Ф.А. и др. // Мед. генет. 2004. № 5. С. 242.
14. Illarioshkin S.N. et al. // Russ. J. Genet. 2002. V. 38. № 12. P. 1447.
15. Рахмонов Р.А., Мадаминова Т.В. // Анн. клин. экспер. неврол. 2014. № 4. С. 15.
16. Иллариошкин С.Н. и др. // Генетика. 1995. № 11. С. 1478.



Продолжается подписка
на научно-практический журнал

“НЕРВНЫЕ БОЛЕЗНИ”

Журнал выходит 4 раза в год. Стоимость подписки на полгода по каталогу агентства “Роспечать” – 420 руб., на один номер – 210 руб. Подписной индекс 81610.



Продолжается подписка
на научно-практический журнал

“АТМОСФЕРА. НОВОСТИ КАРДИОЛОГИИ”

Журнал выходит 4 раза в год. Стоимость подписки на полгода по каталогу агентства “Роспечать” – 380 руб., на один номер – 190 руб. Подписной индекс 37211.

Подписку можно оформить в любом отделении связи России и СНГ.
Редакционную подписку на эти и любые другие журналы издательства “Атмосфера” можно оформить на сайте <http://atm-press.ru> или по телефону: (495) 730-63-51