

9. Стоматологическая заболеваемость населения России. Состояние тканей пародонта и слизистой оболочки рта / под ред. О.О. Янушевича. – М., 2009. – 228 с.

Dental diseases of Russia's population. The state of parodontium tissues and mouth mucus

membrane / by edition of O.O. Yanushevitch. – М., 2009. – 228 p.

10. Федеральная государственная программа первичной профилактики стоматологических заболеваний среди населения России (Проект) / П.А. Леус, Э.М. Кузьми-

на, Л.Н. Максимовская [и др.]. – М., 2011. – 68 с.

Federal state program of first prophylaxis of dental diseases of Russia's population (Project) / P.A. Leus, E.M. Kuzmina, L.N. Maksimovskaya [and others]. – М., 2011. – 68 p.

П.И. Гурьева, Н.Р. Максимова, Т.Я. Николаева,
И.А. Николаева, Е.Е. Гуринова, М.Н. Коротов, С.К. Степанова,
А.Л. Сухомясова, Л.Т. Оконешникова

КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЕЗНИ ШАРКО-МАРИ-ТУТА 1А ТИПА В РЕСПУБЛИКЕ САХА (ЯКУТИЯ)

УДК 616-056.7.8

В данной статье представлена клинико-генетическая характеристика болезни Шарко-Мари-Тута 1А типа. Методом молекулярно-генетического анализа выявлены пациенты, составившие 38% от всех типов ШМТ. Распространенность болезни составила 4,5 на 100 тыс. населения. Методом фрагментного анализа с использованием динуклеотидных STR-маркеров (*D17S2218*, *D17S2223*, *D17S2229*) исследовано 98 образцов ДНК больных с ШМТ и выборка из здоровых лиц якутской этнической группы ($n=100$). По маркерам *D17S2218* и *D17S2229* была выявлена высокая гетерозиготность (по 76%), т.е. данные маркеры являются информативными в якутской популяции и могут быть использованы для выявления дупликации.

Ключевые слова: болезнь Шарко-Мари-Тута 1А типа, ген *PMP22*, распространенность, фрагментный анализ ДНК.

This article presents clinical and genetic characteristics of Charcot-Marie-Tooth type 1A disease. By molecular genetic analysis the authors revealed 43 patients, accounting for 38% of all types of CMT. Prevalence of the disease was 4.5 per 100000 of population. Using fragment analysis method with dinucleotide STR-markers (*D17S2218*, *D17S2223*, *D17S2229*) they examined 98 DNA samples of patients with CMT and a sample of healthy individuals of Yakut ethnic group ($n = 100$). By markers *D17S2218* and *D17S2229* the authors revealed a high heterozygosity (to 76%), i.e. these markers are informative in the Yakut population and can be used to identify duplication.

Keywords: disease Charcot-Marie-Tooth type 1A, the *PMP22* gene, prevalence, DNA fragment analysis.

Введение. Болезнь Шарко-Мари-Тута (ШМТ, наследственная моторно-сенсорная нейропатия, НМСН) – обширная группа наследственных болезней нервной системы, характеризующихся хронически прогрессирующей слабостью и атрофией дисталь-

ных мышц конечностей, снижением сухожильных рефлексов, деформацией стоп и кистей, изменением походки и сенсорными нарушениями [4]. Распространенность болезни ШМТ в мире составляет 1 на 2500 чел. [8]. В России этот показатель в среднем составляет 5,64 на 100 тыс. населения с колебаниями от 1,07 до 15,95 [5]. В настоящее время идентифицировано около 50 локусов и 30 различных генов, ответственных за формирование фенотипа ШМТ [13]. Наиболее распространенной формой является ШМТ 1А с аутосомно-доминантным типом наследования (OMIM 118220) [2]. Причиной является мутация в гене *PMP22* (peripheral myelin protein). Основной тип мутации в этом гене – дупликация 1,5 Мб в области хромосомы 17p11.2-12 [2,8,9,12]. Ведущее место в структуре генетической патологии в Республике Саха (Якутия) занимают наследственные болезни нервной системы [3]. При этом первое место среди всех моногенных неврологических заболеваний занимают нервно-мышечные болезни, ШМТ является одной из самых распространенных в этой группе [3,6,7].

В данной статье приведены результаты клинико-генеалогического и молекулярно-генетического исследования болезни ШМТ 1А типа в РС (Я).

Материал и методы исследования. Проанализированы случаи собс-

твенных и ретроспективных клинических наблюдений больных из данных Республиканского генетического регистра наследственной и врожденной патологии РС (Я) в Медико-генетической консультации ГБУ РС(Я) РБ №1 – Национального центра медицины, данных годовых отчетов неврологов со всей республики, материалов неврологического отделения ГБУ РС(Я) РБ №2-ЦЭМП, экспедиций в улусы республики. В исследование были включены 113 больных (54 женщины и 59 мужчин) с клиническим диагнозом болезнь ШМТ из 85 неродственных семей. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «Якутский научный центр комплексных медицинских проблем» СО РАМН.

Методом количественного определения аллелей внутрилокусных микросателлитных маркеров гена *PMP22* (OMIM 601097) были исследованы: на первом этапе выборка из здоровых лиц якутской популяции ($n=100$), на втором этапе – 98 доступных образцов ДНК больных с ШМТ (36 больных с ШМТ 1А типа и 62 – с неизвестным типом). Для молекулярно-генетического анализа были использованы образцы геномной ДНК больных с ШМТ, взятые с письменного информированного согласия. Популяционная выборка из 100 здоровых неродственных якутов была сделана по данным Банка ДНК наследственной

ГУРЬЕВА Полина Иннокентьевна – м.н.с. учеб.-науч. лаб. «Геномная медицина» Медицинского института СВФУ им. М.К. Аммосова», аспирант, GurievaPI@yandex.ru; **МАКСИМОВА Надежда Романовна** – д.м.н., зав. лаб. ЯНЦ комплексных медицинских проблем СО РАМН, зав. учеб.-науч. лаб. «Геномная медицина» МИ СВФУ, pogan@yandex.ru; **НИКОЛАЕВА Татьяна Яковлевна** – д.м.н., проф., зав. кафедрой МИ СВФУ, tyanic@mail.ru; **НИКОЛАЕВА Ирина Аверьевна** – врач генетик медико-генетической консультации РБ №1-Национальный центр медицины, н.с. ЯНЦ КМП СО РАМН; **ГУРИНОВА Елизавета Егоровна** – врач генетик МГК, н.с. ЯНЦ КМП СО РАМН; **КОРОТОВ Мефодий Николаевич** – м.н.с. ЯНЦ КМП СО РАМН; **СТЕПАНОВА Светлана Кимовна** – врач лаборант МГК, с.н.с. ЯНЦ КМП СО РАМН; **СУХОМЯСОВА Айталипа Лукична** – к.м.н., зав. МГК, зав. лаб. ЯНЦ КМП СО РАМН, AitalinaS@yandex.ru; **ОКОНЕШНИКОВА Людмила Тимофеевна** – врач невролог высшей квалификации, зав. отделением РБ №2-Центра экстренной медицинской помощи МЗ РС(Я).

и врожденной патологии и популяций народов РС (Я). Молекулярно-генетический анализ проведен на базе молекулярно-генетической лаборатории РБ №1-НЦМ МЗ РС (Я) и НОЦ «Генетическое здоровье населения» ФГАОУ ВПО «Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова». Выделение геномной ДНК проводили из лейкоцитов крови методом фенольно-хлороформной экстракции.

Поиск дупликации в гене *PMP22* осуществляли методом фрагментного анализа на генетическом анализаторе ABI Prism 3130 («Applied Biosystems») с использованием протокола фирмы-производителя. Используемые в исследовании маркеры *D17S2218*, *D17S2223* и *D17S2229* (табл.1) относятся к ряду высокополиморфных (CA)_n – повторов, тесно сцепленных с геном *PMP22*, применяемых для поиска дупликаций и анализа сцепления с локусом 17p11.2 [1,10,11].

Статистический анализ проведен с использованием пакета SPSS 16.0. Описательная статистика для количественных признаков представлена в виде среднего значения и стандартного отклонения, а для качественных признаков – в виде абсолютных значений, процентных долей. Наблюдаемую гетерозиготность рассчитывали в процентах.

Результаты и обсуждение. Общая распространенность болезни Шарко-Мари-Тута в Республике Саха (Якутия) на 1 января 2013 г. составила 11,8 на 100 тыс. населения. Болезнь ШМТ в нашей республике выявлена среди якутов (86 больных), русских (23 больных) и по 1 больному из разных этнических групп (эвенк, молдаван, ногаец, украинец). Доля якутов среди больных с ШМТ преобладала и составила 76% распространенностью среди якутского населения 18,4 на 100 тыс. населения.

Диагноз болезнь Шарко-Мари-Тута 1А типа выставлен на основании молекулярно-генетического анализа 43 больным из 113, что составило 38% от всех форм ШМТ. Распространенность болезни ШМТ 1А типа в республике составила 4,5 на 100 тыс. населения. При анализе родословных 43 пациентов с болезнью ШМТ 1А из 27 неродственных семей в 24 семьях выявлялся аутосомно-доминантный тип наследования, в 3 семейной отягощенности выяснить не удалось. По половому признаку больные распределились следующим образом: мужчин – 25, женщин – 18, по этническому признаку: русских – 15 (35%), якутов – 28 (65%). Средний

Краткая характеристика используемых микросателлитных маркеров гена *PMP22* [11]

Маркер	Праймеры (прямой и обратный) 5'	Размер аллелей (п.н.)	Число аллелей
<i>D17S2218</i>	F - (FAM) - AAATGCTTGTGGATTAGTTG R-GTGTCTTGGGTACCTTTATGTTTCTT	196-230	12
<i>D17S2223</i>	F - (FAM) - TACAAGAAAGGGAACAAAGC R-GTGTCTTTGAAGAAGCAAGAGACGAGT	151-179	15
<i>D17S2229</i>	F - (FAM) - CCCATTCCATAGTCATCAGA R-GTGTCTTGGCCATTTACCACAAGAGG	243-269	13

возраст больных составил 32,2±15,7 года, у женщин – 30,7±15,7, у мужчин – 33,4±15,9 года. Статистически значимых различий в среднем возрасте у больных мужского и женского пола не выявлено ($p=0,530$). Средний возраст манифестации составил 13,0±9,7 года. Средняя длительность заболевания составила 18,6±13,3 года. Первыми симптомами больные отметили слабость в ногах, деформацию пальцев стоп, самих стоп, нарушение походки, боли в ногах, частые падения.

В клинической картине ведущими симптомами (табл. 2) у обследованных больных явились гипо- или арефлексия нижних конечностей (95%) и деформация стоп по типу фридриховых или полых, которая была выявлена практически у всех (в 40 случаях (93%)). Также у больных были выявлены мышечная гипотрофия дистальных отделов нижних и верхних конечностей (70 и 49%), нарушение чувствительности по полиневритическому типу (70%), мышечная слабость дистальных отделов конечностей (93%). Нарушение походки у наших пациентов в большинстве случаев было в виде степпажа – 40 случаев (93%). Сколиоз был выявлен в 19% случаев.

Особенности клинических проявлений ШМТ 1А типа приведены на примере истории болезни одной якутской семьи, выявленной нами, фрагмент родословной которой представлен на рис. 1. За консультацией обратилась больная В., 8 лет (III-1). В семье пробада больны 2 сибса. Передача заболевания произошла от отца, у которого также больны

Таблица 1

Таблица 2

Клинические симптомы больных с ШМТ 1А типа

Симптом	Кол-во больных, абс. число (%)
Мышечная слабость нижних конечностей	40 (93)
Мышечная гипотрофия нижних конечностей	30 (70)
Нарушение поверхностной чувствительности по полиневритическому типу	30 (70)
Гипо- или арефлексия нижних конечностей	41 (95)
Деформация стоп	36 (84)
Сколиоз	40 (93)
Степпаж	8 (19)

2 сестры и племянник. Заболевание у пробада началось в 7 лет, первыми симптомами были слабость в ногах и руках, утомляемость; у отца возраст манифестации заболевания составил 12 лет, заболевание началось также со слабости в руках, ногах. В неврологическом статусе у пробада выявлялись ограничение тыльного разгибания стоп, снижение мышечной силы в дистальном отделе нижних ко-

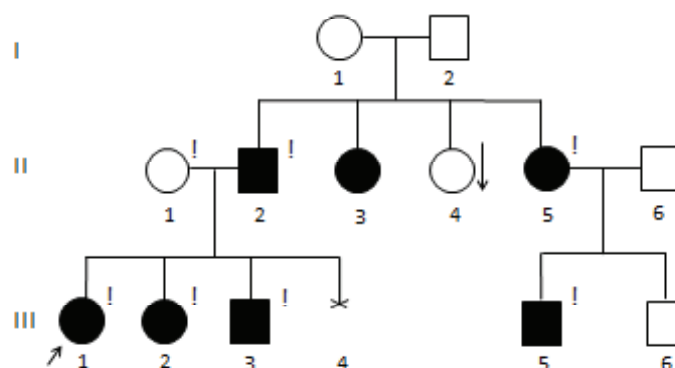


Рис.1. Фрагмент родословной якутской семьи К. с диагнозом болезнь ШМТ 1А типа: □ – мужчина, ○ – женщина, ■, ● – больные с ШМТ; □, ○ – здоровые; х – прерывание по показаниям (пренатальная диагностика), ! – лично обследованные, ↓ – умершие. I, II поколение – родители, III поколение – больные и их сибсы

нечностей до 3,5 баллов, деформация стоп по типу фридрейховых, нарушение походки по типу «степпажа», снижение глубоких сухожильных рефлексов с рук и ног, ЭНМГ выявляла синдром нарушения проведения по *n. peroneus, tibialis, medianus, ulnaris* с обеих сторон выраженной степени по демиелинизирующему типу.

У сестры (III-2) возраст манифестации составил 9 лет, при осмотре выявлялись нарушение походки по типу «степпажа», снижение сухожильных рефлексов, высокий свод стоп, гипестезия по полиневритическому типу, гипотрофия дистальных отделов нижних конечностей, слабость тыльного разгибания стоп, по данным ЭНМГ: синдром нарушения проведения по периферическим нервам рук и ног сильно выраженной степени по демиелинизирующему типу.

У брата (III-3) заболевание дебютировало в возрасте 9 лет, в неврологическом статусе обнаружено легкое ограничение тыльного разгибания стоп, снижение только ахилловых рефлексов, гипестезия стоп, отсутствие деформации стоп, гипотрофия перонеальных мышц голени больше справа. ЭНМГ выявляла синдром нарушения проведения по периферическим нервам рук и ног выраженной степени по демиелинизирующему типу.

У отца (II-2) при обследовании выявили: выраженную гипотрофию мышц нижних конечностей с уровня нижней трети бедер по типу «ног аиста», походку со «степпажем», отсутствие коленных и ахилловых рефлексов, снижение силы в перонеальной группе мышц до 3 баллов, деформацию стоп по типу фридрейховых, гипестезию по типу «носков». При ЭНМГ также выявлен синдром нарушения проведения по типу демиелинизирующей полинейропатии выраженной степени.

У 4 членов данной семьи и 2 родственников методом фрагментного анализа выявлена дупликация 1,5 Мб в области хромосомы 17p11.2-12 в гене *PMP22* (рис. 2).

Таким образом, у всех больных этой семьи по данным ЭНМГ выявлялся демиелинизирующий тип нарушения

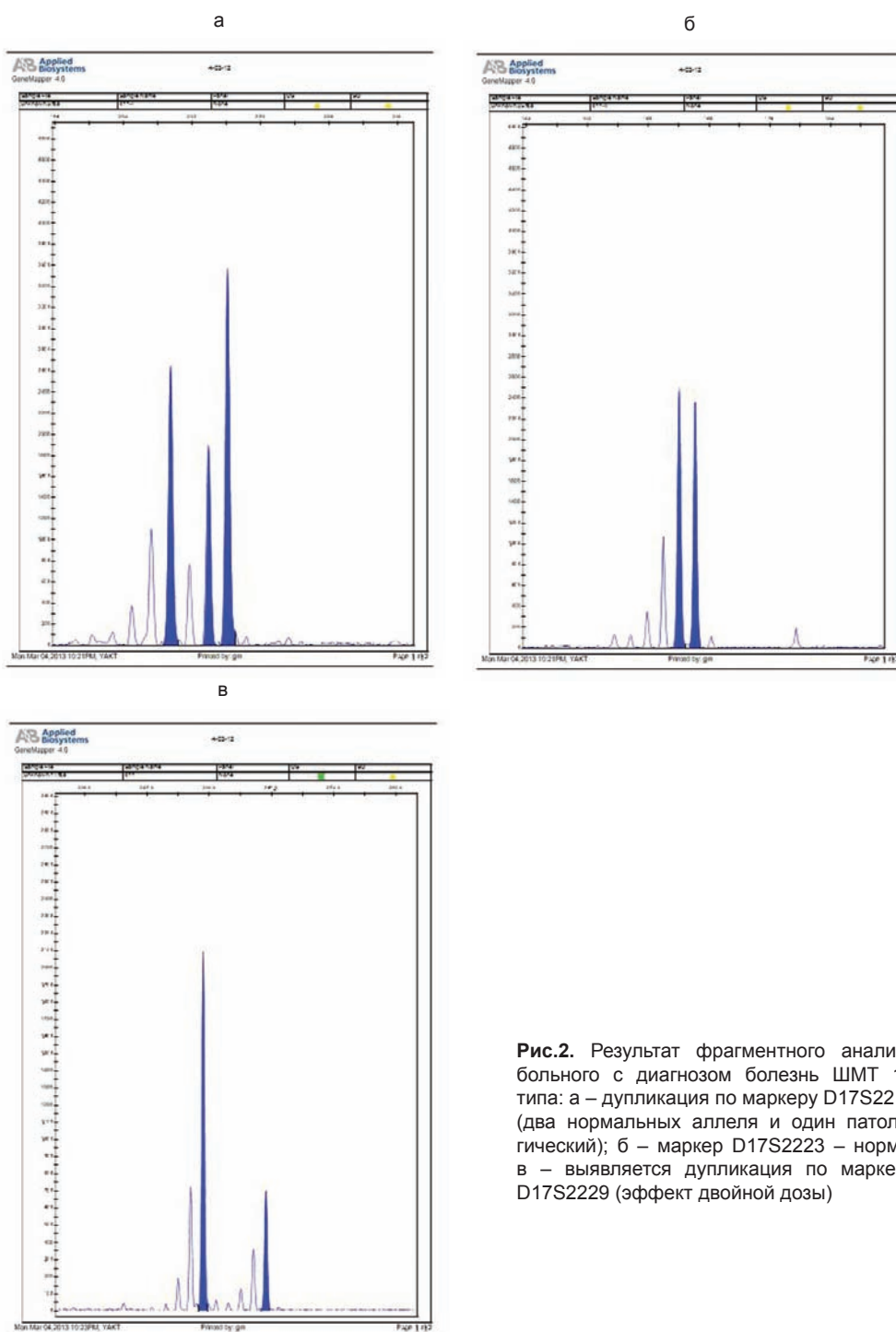


Рис.2. Результат фрагментного анализа больного с диагнозом болезнь ШМТ 1А типа: а – дупликация по маркеру D17S2218 (два нормальных аллеля и один патологический); б – маркер D17S2223 – норма; в – выявляется дупликация по маркеру D17S2229 (эффект двойной дозы)

чувствительности, что соответствует ШМТ 1А типа, в клинической картине у больных наблюдался синдром полинейропатии различной степени выраженности. В данной семье была проведена пренатальная диагностика и выявлена мутация у плода, в связи с чем было рекомендовано прерывание беременности. Семья внесена в Республиканский генетический регистр наследственной и врожденной патологии, будет продолжено последующее долгосрочное наблюдение.

Молекулярно-генетический анализ. До 2011 г. в медико-генетической лаборатории РБ№1-ИЦМ для поиска дупликаций в гене *PMP22* использовали фирменный набор «CMT-dup» (ООО «Центр молекулярной генетики», Москва) с последующим электрофорезом в 8%-ном полиакриламидном геле (ПААГ), который в 11% случаев показал неинформативные результаты анализа.

В настоящем исследовании были использованы динуклеотидные STR-маркеры (*D17S2218*, *D17S2223*,

D17S2229) с последующей визуализацией на автоматическом генетическом анализаторе. Вначале был проведен фрагментный анализ в выборке здоровых лиц якутской популяции ($n=100$) и рассмотрена гетерозиготность для изучаемых STR-маркеров (табл.3).

По маркерам *D17S2218* и *D17S2229* была выявлена высокая гетерозиготность (по 76%), т.е. данные маркеры являются информативными в якутской популяции и могут быть использованы для выявления дупликации. Маркер *D17S2223* оказался менее информативным (гетерозиготность 49%), хотя при этом в других этнических группах (кавказская, афро-американская, азиатская, испанская) гетерозиготность по данному маркеру была высокой (более 70%) [11].

Далее методом количественного определения аллелей внутрилокусных микросателлитных маркеров гена *PMP22* было исследовано 98 доступных образцов ДНК больных с ШМТ (36 больных с ШМТ 1А типа и 62 с неизвестным типом). Из 98 пациентов у 38 (39%) выявлена дупликация 1,5 Мб в области хромосомы 17p11.2-12 в гене *PMP22*, при этом дополнительно были выявлены 2 пациента с ШМТ 1А типа, у которых ранее анализы с использованием реагентов фирменного набора «СМТ-dup» были отрицательными. Ранее неинформативные результаты больных оказались отрицательными.

Также мы рассмотрели количество обнаруженных дупликаций для каждого STR-маркера среди больных с ШМТ1А типа, выявленной нами методом фрагментного анализа (табл. 4). Оказалось, что высокая частота дупликации была обнаружена с использованием маркера *D17S2229* – 35 из 37, низкая частота – с маркером *D17S2223* – 14 из 37.

Среди больных с ШМТ 1А типа якутской этнической группы также было выявлено, что высокая частота дупликации была обнаружена с использованием маркера *D17S2229* – 26 из 27, низкая частота маркера *D17S2223* – 9 из 27.

Выводы. Распространенность всех типов болезни Шарко-Мари-Тута в Республике Саха (Якутия) составила 11,8 на 100 тыс. населения, что является средним показателем по России. Среди якутов частота 18,4 на 100 тыс. населения, что несколько выше, чем в среднем по Российской Федерации, но в соотношении с мировыми данными это средний показатель. Распространенность болезни ШМТ 1А типа в нашей республике составила 4,5 на 100

Гетерозиготность STR-маркеров болезни ШМТ1А в различных этнических группах [11]

Маркер	Гетерозиготность, %				
	Популяция				
	кавказская	афро-американская	азиатская	испанская	якутская*
<i>D17S2218</i>	87	78	77	69	76
<i>D17S2223</i>	71	75	81	71	49
<i>D17S2229</i>	93	86	81	71	76

* Собственные данные.

тыс. населения. В клинической картине заболевания выявлялись разной степени выраженности синдром полинейропатии и деформация стоп.

Для обнаружения дупликации 1,5 Мб в области хромосомы 17p11.2-12 в гене *PMP22* в якутской популяции могут быть предложены два информативных маркера *D17S2218* и *D17S2229*.

Внедрение молекулярно-генетических методов в практику медико-генетического консультирования в Республике Саха (Якутия) позволило не только диагностировать болезнь Шарко-Мари-Тута в семьях, но и проводить дифференциальную диагностику заболеваний со сходным фенотипом.

Литература

1. Идентификация мутаций, ассоциированных с развитием нейродегенеративных заболеваний: инструкция по применению / Т.В. Осадчук [и др.]; отв. ред. Т.В. Осадчук. - Минск: ГУ «Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя», 2009. - 12 с.
2. Identification of mutations associated with the development of neurodegenerative diseases: the instructions for use / Osadchuk T.V. [et al.]; responsible editor T.V. Osadchuk. - Minsk: GI "Republican Scientific and Practical Centre" Mother and Child", 2009. - P. 12.
3. Классификация и алгоритмы диагностики различных генетических вариантов наследственных моторно-сенсорных полинейропатий / Т.Б. Миловинова, О.А. Щагина, Е.Л. Дадали, А.В. Поляков // Медицинская генетика. - 2011. - №4. - С. 10-16.
4. Classification and diagnostic algorithms different genetic variants of hereditary motor and sensory polyneuropathy / T.B. Milovidova, O.A. Shchagina, E.L. Dadali, A.V. Poliakov // Medical Genetics. - 2011. - Vol. 4. - P. 10-16.
5. Наследственные болезни нервной системы в Республике Саха (Якутия) / И.А. Николаева [и др.] // Якутский медицинский журнал. - 2009. - №2. - С. 52-54.
6. Hereditary diseases of the nervous system in the Republic of Sakha (Yakutia) / I.A. Nikolaeva [et al.] // Yakut medical journal. - 2009. - Vol.2. - P. 52-54.
7. Новая форма наследственной невропатии: болезнь Шарко-Мари-Тута типа 2F / С.Н. Иллариошкин [и др.] // Атмосфера. Нервные болезни. - 2005. - №2. - С. 42-46.
8. A new form of hereditary neuropathy: Charcot-Marie-Tooth disease type 2F / S.N. Illarioshkin [et al.] // The Atmosphere. Nervous Diseases. - 2005. Vol.2. - P. 42-46. 1.
9. Руденская Г.Е. Наследственные болезни

Таблица 3

Таблица 4

Частота обнаружения дупликации для каждого маркера среди всех пациентов с ШМТ1А типа ($n=37$) и отдельно среди якутов ($n=27$)

Маркер	Обнаружение дупликации	
	все пациенты	якуты
<i>D17S2218</i>	24/37	16/27
<i>D17S2223</i>	14/37	9/27
<i>D17S2229</i>	35/37	26/27

нервной системы в российских и среднеазиатских популяциях: клиничко-генетико-эпидемиологическое исследование: автореф. дис. ... д-ра мед.наук / Г.Е. Руденская. - М., 1998. - 43 с.

Rudenskaia G.E. Hereditary diseases of the nervous system in the Russian and Central Asian populations: clinical and genetic-epidemiological study: summary of the diss. for the degree of PhD MD / G.E. Rudenskaia. - M, 1998. - P.43.

6. Структура и разнообразие наследственной патологии в Республике Саха (Якутия) / Л.А. Тарская [и др.] // Генетика. - 2004. - Т. 40, №11. - С. 1530-1539.

Structure and diversity of hereditary diseases in the Republic of Sakha (Yakutia) / L.A. Tarskaya [et al.] // Genetics. - 2004. - T.40, vol. 11. - P.1530-1539.

7. Этнотипическая наследственная патология в Республике Саха (Якутия) / Н.Р. Максимова, А.Л. Сухомьясова, А.Н. Ноговицына, В.П. Пузырев // Якутский медицинский журнал. - 2009. - №2. - С. 15-19.

Ethnic specific hereditary pathology in Republic of Sakha (Yakutia) / N.R. Maksimova, A.L. Sukhomiasova, A.N. Nogovitsyna, V.P. Puzyrev // Yakut medical journal. - 2009. - Vol. 2. P. 15-19.

8. Charcot-Marie-Tooth Disease Subtypes and Genetic Testing Strategies / ASD Saporta [et al.] // Annals of Neurology. - 2011. - Vol. 69. - P.22-33.

9. DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A / JR Lupski [et al.] // Cell. - 1991. - Vol. 66. - P. 219-232.

10. Duplication analysis in Turkish Charcot-Marie-Tooth type 1A patients using short tandem repeat markers / F Koç, AI Güzel, Y Sarica, H Kasap // International Journal of Neuroscience. - 2007. - Vol. 117. - P. 1611-1619.

11. New Polymorphic Short Tandem Repeats for PCR-based Charcot-Marie-Tooth Disease Type 1A Duplication Diagnosis / JL Badano, K Inoue, N Katsanis, JR Lupski // Clinical Chemistry. - 2001. - Vol. 47. - P. 838-843.

12. The peripheral myelin protein gene *PMP-22* is contained within the Charcot-Marie-Tooth disease type 1A duplication / V Timmerman [et al.] // Nature Genetics. - 1992. - Vol. 1. - P. 171-175.

13. <http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/Home/IPN.cfm>.