

в платные услуги, которые к тому же осуществляются еще и лицами, не прошедшими специальную профессиональную подготовку в области ПД наследственных болезней, ведет к низкой выявляемости самого частого генетического заболевания – синдрома Дауна. Эффективность дородовой диагностики социальнозначимого синдрома Дауна в РС(Я) составила 18%: у новорожденных детей – 98 случаев, пренатально (у плода) – 21 случай.

По опыту работы пренатальной службы зарубежных стран только комплексное обследование супругов, женщины во время беременности и ее будущего ребенка позволяет добиться максимальной эффективности ПД хромосомных болезней. Наиболее удобной является такая организация ПД, когда все звенья этой службы сосредоточены в одном центре, где женщина может пройти полное обследование, включая пренатальное медико-генетическое консультирование, неинвазивное обследование (ультразвуковое и биохимическое) и при необходимости инвазивную пренатальную цитогенетическую диагностику. Благодаря этому снимается психоэмоциональное напряжение женщины, связанное с длительным ожиданием результатов диагностики.

Реализация профилактики некорригируемой наследственной патологии зависит не только от четкой организации инфраструктуры службы ПД, но и от ответственности самой семьи за здоровье будущего ребенка. Необходимо развивать комплекс социального маркетинга, направленный на

пропаганду здорового образа жизни и генетического здоровья. По данным последнего мультицентрового исследования эффективности пренатальной службы РФ в 2005 г., 42% женщин, родивших детей с синдромом Дауна, не наблюдались по беременности или не проходили ультразвуковое обследование в диагностических центрах [3].

Необходимо также постоянно специалистам медико-генетической службы повышать уровень генетической подготовленности медицинского персонала (участковые врачи-гинекологи, акушерки) непосредственно контактирующие с будущими родителями, разъяснять о необходимости медико-генетического консультирования до беременности, а также о сроках, необходимых для проведения инвазивной диагностики во время беременности. По результатам работы кабинета пренатальной диагностики МГК, 25% беременных женщин на приеме у врача-генетика не готовы психологически к восприятию информации о возможностях пренатальной диагностики. При наличии показаний к инвазивной диагностике женщины отказывались от данного вида обследования, что впоследствии привело рождению детей с синдромом Дауна в нескольких случаях. Инвазивные исследования проводились в третьем триместре беременности из-за позднего обращения женщин в МГК (8%), в результате 12 % случаев патологии выявлено на данном сроке беременности.

Обязательным условием эффективности службы является также скоординированная работа всех ее звеньев.

Таким звеном является регулярное обсуждение на врачебных конференциях каждого клинического случая, требующего проведения инвазивной диагностики. Несмотря на кажущиеся простоту исполнения и безопасность забора плодного материала, – это оперативное вмешательство, и даже минимальный риск не должен превышать риск наличия хромосомной патологии у плода. В практике пренатального отдела МГК было зарегистрировано 6 случаев прерывания беременности после оперативного вмешательства в полость матки с диагностической целью.

Как показывает анализ мирового опыта, даже наиболее эффективная организация службы пренатальной диагностики по выявлению врожденных наследственных заболеваний не оказывает заметного влияния на величину перинатальных потерь. Вместе с тем пренатальная диагностика может реально повлиять на величину генетического груза и прежде всего на частоту хромосомных болезней у детей.

Литература

1. Баранов В.С. Цитогенетика эмбрионального развития человека: Научно-практические аспекты / В.С. Баранов, Т.В. Кузнецова // СПб.: Издательство Н-Л, 2007, – С. 288-374.
2. Ворсанова С.Г. Медицинская цитогенетика / С.Г. Ворсанова, Ю.Б. Юров, В.Н. Чернышев // Медпрактика. – М., 2006. – С.10.
3. Юдина Е.В. Мультицентровое исследование «Дородовая диагностика синдрома Дауна в России в 2005 году...» / Е.В. Юдина, М.В. Медведев // Пренатальная диагностика. – М.: Реальное время, 2007. – Т.6, № 4. – С.252-257.

Х.А. Куртанов, Н.Р. Максимова, С.К. Степанова, А.Л. Сухомясова ВНЕДРЕНИЕ ДНК-ДИАГНОСТИКИ ОКУЛОФАРИНГЕАЛЬНОЙ МИОДИСТРОФИИ В ПРАКТИКУ МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОНСУЛЬТИРОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ САХА (ЯКУТИЯ)

УДК 61:575

В практику медико-генетического консультирования республики Саха (Якутия) внедрен способ окулофарингеальной миодистрофии с помощью молекулярно-генетического исследования мутации в гене PABPN1. Данный метод быстрый в исполнении, недорогой и точный.

Ключевые слова: Окулофарингеальная миодистрофия, полимеразная цепная реакция, PABPN1.

In practice of medical-genetic consultation of Republic Sakha (Yakutia) the way of diagnostics of oculopharyngeal myodystrophy by means of molecular-genetic research of a mutation in PABPN1 gene is introduced. The given method is fast in execution, cheap and exact.

Keywords: oculopharyngeal myodystrophy, polymerase chain reaction, PABPN1.

ВВЕДЕНИЕ

Внедрение новых современных методов диагностики наследственных заболеваний в практическую медицину приобрело особую актуальность в нашей республике в связи с высокой частотой наследственной патологии

(спиноцеребеллярная атаксия 1-го типа [6], миотоническая дистрофия, наследственная энзимопеническая метгемоглобинемия, 3-М синдром [2], окулофарингеальная миодистрофия [2] и т.д.). В настоящее время в республике внедрены более десятка

КУРТАНОВ Харитон Алексеевич – м.н.с. ЯНЦ СО РАМН; МАКСИМОВА Надежда Романовна – гл.н.с., к.м.н. ЯНЦ СО РАМН; СТЕПАНОВА Светлана Кимовна – биолог медико-генетической консультации РБ №1-НЦМ; СУХОМЯСОВА Айтилина Лукична – к.м.н., зав. медико-генетической консультации РБ №1-НЦМ.

новых методов диагностики наследственных заболеваний (молекулярно-генетические, цитогенетические, биохимические). Однако эффективных методов лечения наследственных заболеваний пока ещё не существует и единственным способом является их профилактика. Точной постановке диагноза придается особое значение не только из-за трудностей клинической диагностики, но также в связи с тем, что при других заболеваниях могут наблюдаться сходные фенотипические проявления. Наиболее информативным методом является ДНК-диагностика с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР). В данной статье мы приводим способ проведения прямой ДНК-диагностики окулофарингеальной миодистрофии – одной из частых наследственных патологий в Республике Саха (Якутия).

Окулофарингеальная миодистрофия (ОФМД, MIM 164300) – наследственное заболевание нервной системы с аутосомно-доминантным типом наследования, манифестирующее обычно на 5-6-м десятилетии жизни. В клинической картине заболевания наблюдается прогрессирующая мышечная слабость и атрофия проксимальных отделов конечностей, расстройства глотания и фонации, птоз, слабость лицевой мускулатуры. Впервые заболевание было описано von Graefe в 1868 г. как «прогрессирующая наружная офтальмоплегия», в 1962 г. Victor с соавторами связал «прогрессирующую наружную офтальмоплегию» с фарингеальной слабостью и дал заболеванию название «окулофарингеальная миодистрофия» [13]. В 1998 г. Braise с соавторами изолировали на хромосоме 14q11.2-13 ген поли-(A)-связывающего белка 2 (*PABP2*, *PABPN1*), ответственный за синтез ядерного белка *PABP2*, служащего фактором полиаденилирования мРНК, и идентифицировали мутацию, заключающуюся в увеличении числа копий тринуклеотидных GCG-повторов в 1-м экзоне гена [11]. В норме ген содержит 6 tandemных копий повторов GCG, а у больных число повторов достигает 8-13 копий. В некоторых популяциях экспансия числа тринуклеотидных повторов происходит за счет простого добавления GCG-повторов [5-10], в других – вместе с экспансией GCG-повторов происходит GCA-вставка [4, 12].

Частота ОФМД в якутской популяции составляет 1:11680 [2], что в 10-20 раз выше частоты, регистрируемой во Франции и Европе [11]. В Якутии

заболевание впервые было зарегистрировано в 1932 г. под названием «бегтюген - своеобразная наследственная форма бульбарного паралича среди якутов», описана клиника болезни в виде опущения верхних век, затруднения прохождения твердой пищи по пищеводу [1]. Последующие исследования выявили высокое накопление ОФМД у якутов. Молекулярно-генетический анализ по определению длин аллелей и прямому секвенированию гена *PABPN1*, проведенный в период с 2005 по 2006 г. совместно с японскими коллегами в НИИ мозга Университета г.Ниигата (Япония), выявил, что причиной развития окулофарингеальной миодистрофии у всех 38 больных якутов и в 2 русских семьях является одинаковое увеличение GCG-повторов до 10 копий в гене *PABPN1* [2] (рис.1-2). Методика прямого ДНК - секвенирования гена является трудоемкой и дорогостоящей и редко применяется в практическом здравоохранении. Поэтому мы освоили и внедрили быстрый метод ДНК-диагностики окулофарингеальной миодистрофии, который возможно применять в рутинной практической работе в лаборатории медико-генетической консультации.

Методика ДНК-исследования

Для молекулярно-генетического анализа были использованы образцы геномной ДНК 50 больных с ОФМД и их 84 клинически здоровых родственников из 45 неродственных семей, а также 46 больных с другими формами миодистрофий, собранные в течение 7 лет в Банке ДНК наследственной и мультифакториальной патологии и популяции народов РС(Я) в меди-

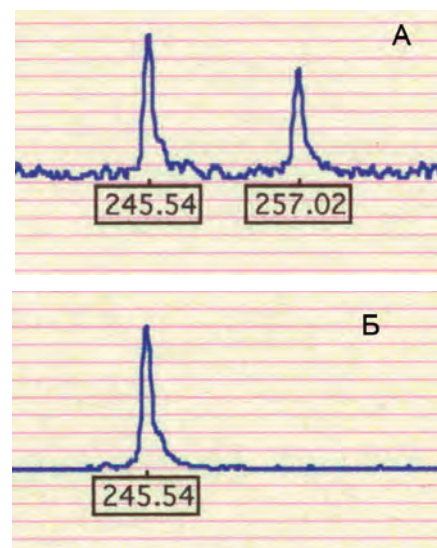


Рис. 1. Результаты электрофореза ДНК у больного с окулофарингеальной миодистрофией (А) и у здорового (Б) на автоматическом ДНК-анализаторе ABI PRISM 310. А – электрофореграмма больного с ОФМД, визуализируются 2 аллеля: нормальный длиной 245 п.о. (6 GCG –повторов) и патологический – 257 п.о. (10 GCG- повторов). Б – электрофореграмма здорового человека, визуализируется 1 нормальный аллель длиной 245 п.о. (6 GCG –повторов)

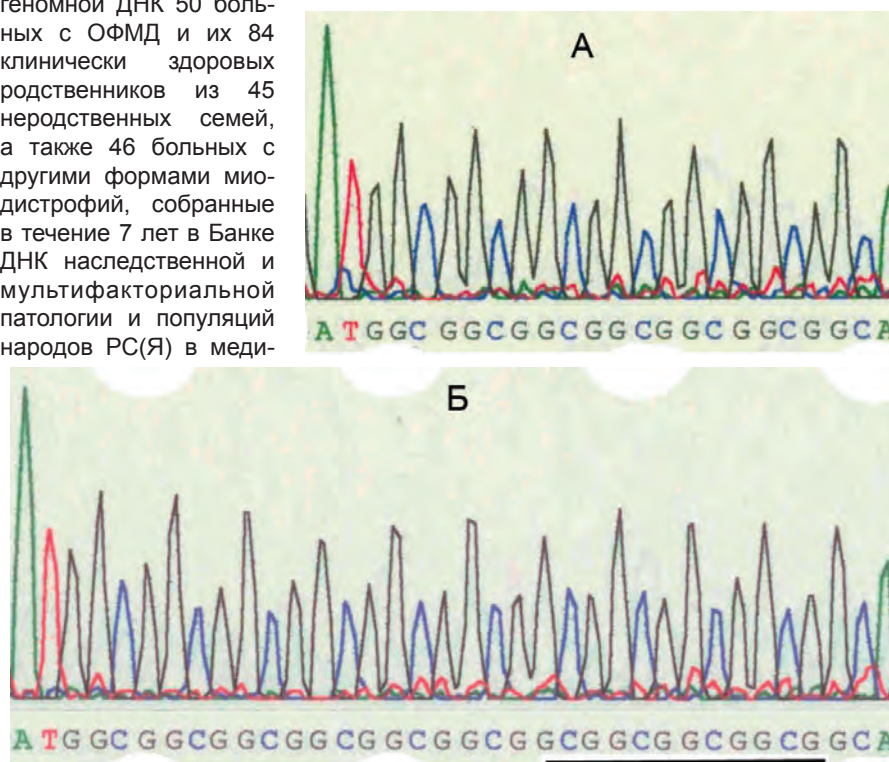


Рис.2. Секвенс участка 1 экзона гена *PABPN1* у здорового (А) и больного (Б) окулофарингеальной миодистрофией человека. У больного (Б) удлинение произошло за счет добавления 4 GCG-повторов (подчеркнуто черной линией)

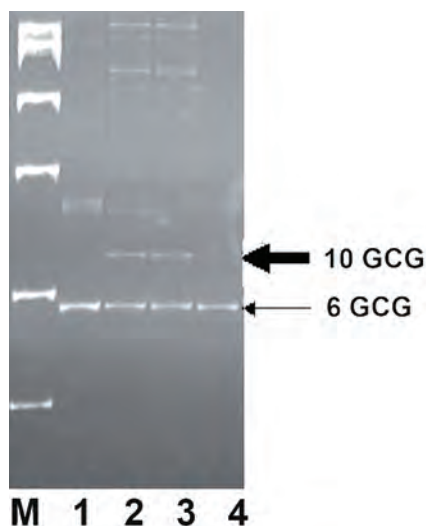


Рис.3. Электрофореграмма продукта амплификации 1 экзона гена в 8%-ном ПААГ. Тонкая стрелка - нормальные аллели, толстая - мутантные. М- маркер PUC19 + msp; 1, 4 - здоровые, гомозиготы по нормальному аллелю, имеют один аллель с 6 GCG-повторами; 2, 3 - больные ОФМД, гетерозиготы, имеют 2 аллеля, один - 6, другой - 10 GCG-повторов

ко-генетической консультации РС(Я). ДНК взято с письменного информированного согласия пациентов. Выделение геномной ДНК проводили из лейкоцитов крови по стандартной методике. Быструю идентификацию мутации в гене *PABPN1* осуществляли методом ПЦР с последующим электрофорезом в 8% ПААГ. ПЦР на программируемом термоблокере MJ Mini (Bio-Rad) в 20 мкл объема реакционной смеси следующего состава: 0,1-1 мкг геномной ДНК; по 0,2 мкМ оригинального олигопраймера F:5'-CGCAGTGGCCCGCCCTTAGA-3', R:5'-ACAAGATGGCGCCGCCGCCCGGC-3'), описанного ранее [11], (по 200 мкМ каждого нуклеозидтрифосфата; 0,5 единиц активности ДНК-полимеразы (Силекс, Россия), Таq буфер(*10) (pH-8,6; 25mM $MgCl_2$) (Силекс, Россия), бетаин 1:2 (Wako, Япония). Визуализацию проводили в УФ-лучах в системе видео - гель - документации (Vilber Lourmat, Франция).

Результаты:

С целью быстрой молекулярно-генетической диагностики окулофарингеальной миодистрофии внедрен способ прямой ДНК-диагностики ОФМД с помощью амплификации тринуклеотидного участка гена с помощью ПЦР и электрофореза в 8%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) (рис.3). Подтверждением клинического диагноза ОФМД служит обнаружение у больно-

Наследственные заболевания диагностируемые в медико-генетической консультации РБ№1 – НЦМ

Название заболевания (ОМIM *)	Тип наследования	Способ диагностики	Ген	Выявляемая мутация
Спинаocerebellарная атаксия 1 типа (164400)	АД	Прямая	<i>ATXN1</i>	Экспансия CAG-повторов
Миотоническая дистрофия (160900)	АД	Прямая	<i>DMPK</i>	Экспансия CTG-повторов
Невральная амиотрофия Шарко-Мари-Тута 1А (118200)	АД	Прямая	<i>PMP22</i>	Дупликация на 17p11.2
3-М синдром (273750)	АР	Прямая	<i>CUL7</i>	4582insT
Окулофарингеальная миодистрофия (164300)	АД	Прямая	<i>PABPN1</i>	Экспансия GCG-повторов
Спино-бульбарная амиотрофия Кеннеди (313200)	Х-сцепленный рецессивный	Прямая	<i>AR</i>	Экспансия CAG-повторов
Спинальная амиотрофия Верднига – Гоффмана (253300)	АР	Прямая	<i>SMN1</i>	Делеции 7, 8 экзона
Атаксия Фридрейха (229300)	АР	Прямая	<i>X25</i>	Экспансия САА-повторов
Миодистрофия Дюшенна – Беккера (310200)	Х-сцепленный рецессивный	Прямая Косвенная	<i>DMD</i>	Делеции в 19 экзонах и промоторной части гена, STR 45, STR 49, STR 50
Гемофилия А (306700)	Х-сцепленный рецессивный	Косвенная	<i>F8C</i>	<i>HindIII</i> , (CA)-повторы
Наследственная энзимопеническая метгемоглобинемия (250800)	АР	Прямая	<i>DIA1</i>	Pro269Leu
Нейросенсорная тугоухость (162400)	АР	Прямая	<i>GJB2</i>	35delG, 167delT, 235delC

*ОМIM – номер в электронной версии каталога В. Маккьюсика «Mendelian Inheritance in Man»: www.ncbi.nlm.nih.gov/omim

АД – аутосомно-доминантный путь наследования

АР – аутосомно-рецессивный путь наследования

го на электрофореграмме двух различных фрагментов ДНК, один из которых имеет нормальный размер (6 GCG копий), другой - патологически удлинен и соответствует экспансии GCG-повторов более 8 копий. Этот анализ был проведен 180 пациентам с подозрением на ОФМД. У всех 50 больных ОФМД выявлено увеличение GCG-повторов, что подтверждает выставленный клинический диагноз заболевания. Из 84 клинически здоровых родственников у 25 выявлена экспансия тринуклеотидных GCG-повторов, что говорит о доклиническом носительстве мутации в гене *PABPN1*. У остальных 76 членовотяженных ОФМД семей и у 46 пациентов с другими формами миодистрофий выявлено 6 GCG-повторов, то есть исключено носительство мутантного гена ОФМД.

Заключение

Мы освоили и внедрили в практику медико-генетического консультирования РБ№1-НЦМ быстрый способ прямой ДНК-диагностики окулофарингеальной миодистрофии, основанный на проведении полимеразной цепной

реакции (ПЦР) с последующей визуализацией в полиакриламидном геле (ПААГ). Методика предполагает непосредственное выявление мутации в исследуемом гене *PABPN1* и позволяет выявить увеличенное количество GCG-повторов у больного ОФМД. Для наследственных болезней с поздней манифестацией, к которым относится окулофарингеальная миодистрофия, с помощью прямой ДНК-диагностики можно подтвердить клинический диагноз у больного, выявить носительство мутантного гена как до проявления симптомов заболевания, так и в пренатальном периоде у плода. Данный способ диагностики имеет ряд преимуществ: точность, быстрота исполнения и низкая себестоимость.

Прямая ДНК-диагностика окулофарингеальной миодистрофии проводится только в федеральном центре – Медико-генетическом научном центре (МГНЦ, г. Москва), где проводится ДНК-диагностика более 100 наследственных заболеваний [3,14]. Согласно приказу №316 Минздрава РФ от 30 декабря 1993г., в Российской Феде-

рации ДНК-диагностика осуществляется только на федеральном уровне, на базе ведущих научно-исследовательских институтов, выполняющих функции федеральных центров, расположенных в трех городах – Москва, Санкт-Петербург и Томск. В Якутии мы имеем первый опыт внедрения таких методов в медицинском учреждении, что, несомненно, способствует совершенствованию лечения больных, особенно превентивного (в доклинической стадии), и позволяет поставить на качественно новый уровень медико-генетическое консультирование. К списку пяти наследственных заболеваний, для которых в период с 2000 по 2005 г. была внедрена ДНК-диагностика, за 2 последних года добавилось еще 7 наследственных заболеваний. В таблице приведен полный список наследственных заболеваний, для которых в настоящее время освоены и внедрены методы ДНК-диагностики в медико-генетической консультации РБ№1-НЦМ. Внедрение новейших достижений в области ДНК-диагностики наследственной патологии решает текущие вопросы диагностики наследственных

моногенных болезней и является особенно актуальным в Республике Саха (Якутия), географически отдаленной от центральных областей России.

Работа частично поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (№07-04-01352-(04-351)-а).

Литература

1. **Зак М.** «Бетюген» - своеобразная наследственная форма бульбарного паралича среди якутов / М. Зак // Советская невропатология и психиатрия. - 1932. - Т.1, №12. - С.814-817.
2. **Клинико-генеалогическая** и молекулярно-генетическая характеристика окулофарингеальной миодистрофии в Республике Саха (Якутия). / Максимова Н.Р. [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2008. - №6. - С.32-35.
3. **Разработка** ДНК-диагностики «по требованию» - возможность рождения здорового ребенка в отягощенных семьях / С.М. Тверская [и др.] // Медицинская генетика. - 2003. - Т. 2. - С. 491-495.
4. **(GCG)11** founder mutation in the PABPN1 gene of OPMD Uruguayan families / M. Rodriguez [at al.] // Neuromusc Disord. - 2005. - 15. - С.185-190.
5. **Mitochondrial** Abnormalities in Genetically

Assessed Oculopharyngeal Muscular Dystrophy / S. Gambelli [at al.] // Eur Neurol. - 2004. - 1. - С.44-147.

6. **Muller T.** GCG repeats and phenotype in oculopharyngeal muscular dystrophy / T. Muller, R. Schoroder, S. Zierz // Musc & Nerve. - 2001. - 24. - С.120-122

7. **Nuclear** accumulation of expanded PABP2 gene product in oculopharyngeal muscular dystrophy / E. Uyama [at al.] // Muscle & Nerve. - 2000. - 23. - С.1549-1554.

8. **Oculopharyngeal** MD among Bukhara Jews is due to a founder (GCG)9 mutation in the PABP2 gene / S.C. Blumen [at al.] // Neurology. - 2000; February (1 of 2): C.1268-1270.

9. **Oculopharyngeal** Muscular Dystrophy in Hispanic New Mexicans // M.W. Beche [at al.] // JAMA. - 2001. - 286. - С.2437-2440.

10. **Oculopharyngeal** muscular dystrophy. Phenotypic and genotypic studies in a UK population / M.E. Hill [at al.] // Brain. - 2001. - 124 - С.522-526.

11. **Short** GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy / B. Braise [at al.] // Nat Gen. - 1998. - 18. - С.164-167.

12. **Unequal** crossing-over in unique PABP2 mutations in Japanese patients / M. Nakamoto [at al.] // Arch neurol. - 2002. - 59. - С.474-477.

13. **Victor M.** Oculopharyngeal muscular dystrophy. A Familial Disease of Late Life characterized by Dysphagia and Progressive Ptosis of the Eyelids / M. Victor, R. Hayes, R.D. Adams // The New Engl J of Med. - 1962. - 267. - С.1267-1272.

14. <http://www.dnalab.ru>.

ПРИОРИТЕТНЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ПРОЕКТ «ЗДОРОВЬЕ»

С.М. Тарабукина, Д.Д. Муксунов

ОБ ОСНАЩЕНИИ ДИАГНОСТИЧЕСКИМ ОБОРУДОВАНИЕМ МУНИЦИПАЛЬНЫХ УЧРЕЖДЕНИЙ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ПО ПРИОРИТЕТНОМУ НАЦИОНАЛЬНОМУ ПРОЕКТУ «ЗДОРОВЬЕ»

Одним из основных направлений приоритетного национального проекта в сфере здравоохранения является развитие первичной медицинской помощи, которое предусматривает укрепление материально-технической базы диагностических служб учреждений первичного звена. Оснащение амбулаторно-поликлинических учреждений необходимым диагностическим оборудованием позволит повысить доступность и качество медицинской помощи, а также сократить сроки ожидания диагностических исследований.

В рамках национального проекта для муниципальных учреждений здра-

воохранения республики за 2006-2007 гг. поставлено 577 единиц диагностического оборудования на общую сумму 273 млн. руб. из федерального бюджета: рентгеновское оборудование – 32 ед., ультразвуковое – 48, лабораторное – 109, эндоскопическое – 112, электрокардиографы – 249, провялочные машины – 11, фетальные мониторы – 16 ед.

Диагностическим оборудованием в рамках национального проекта за 2006-2007 гг. оснащены 185 учреждений из 598 ЛПУ республики, что составляет 31 %, или из 370 ЛПУ, оказывающих врачебную помощь (50 %), в том числе:

- центральные районные больницы – 34 из 34 (100%),
- городские больницы – 13 из 18 (72),
- поликлиники – 2 из 4 (50),
- районные больницы – 2 из 2 (100),

- детские городские больницы – 1 из 2 (50),

- участковые больницы – 113 из 172 (65,7),

- врачебные амбулатории – 16 из 56 (28,6%),

Из 577 единиц оборудования поставлено в учреждения:

- центральные районные больницы – 287 ед. (49,7 %),

- городские больницы – 90 ед. (15,6),

- поликлиники – 22 ед. (3,8),

- районные больницы – 10 ед. (1,7),

- детские городские больницы – 3 ед. (0,5),

- участковые больницы – 143 ед. (24,8),

- врачебные амбулатории – 22 ед. (3,8%).

При анализе материально-технической оснащенности ЛПУ РС (Я) в 2005 г. было выявлено, что материально-техническая оснащенность

ТАРАБУКИНА Сардана Макаровна – руководитель Управления фармации и медицинской техники Министерства здравоохранения РС (Я); **МУКСУНОВ Дмитрий Дмитриевич** – гл. специалист Управления фармации и медицинской техники Министерства здравоохранения РС (Я).