

Алгоритмы диагностики псевдогипертрофических прогрессирующих мышечных дистрофий

Е.Л. Дадали, Е.В. Подагова, С.А. Мальмберг, А.Б. Кузнецов

Поясно-конечностные прогрессирующие мышечные дистрофии (ПКМД) – группа генетически гетерогенных заболеваний, характеризующихся изолированным или преимущественным поражением мышц плечевого и тазового поясов конечностей [1, 3, 4, 17, 19]. Показано, что наиболее злокачественное течение, приводящее к ранней инвалидизации и гибели больных, характерно для так называемых псевдогипертрофических вариантов ПКМД. Особенностью этих нозологических форм является увеличение объема различных мышечных групп, формирующееся за счет прогрессирующей гибели миофибрилл с последующим замещением их соединительной тканью. В группе псевдогипертрофических ПКМД выделяют дистрофинопатии и саркогликанопатии. Дистрофинопатии включают прогрессирующие мышечные дистрофии (ПМД) Дюшенна и Беккера, которые представляют собой аллельные варианты, обусловленные различными мутациями в гене белка дистрофина и наследующиеся по X-сцепленному ре-

цессивному типу. Группа саркогликанопатий представлена 4 вариантами ПКМД – 2C-, 2D-, 2E-, 2F-типов, наследующихся по аутосомно-рецессивному типу и обусловленных мутациями в генах четырех трансмембранных белков – α -, β -, γ - и δ -саркогликанов. Имеющиеся в литературе немногочисленные работы, посвященные проведению клинко-генетических корреляций, показали отсутствие выраженных различий клинических проявлений ПМД Дюшенна и саркогликанопатий, что можно объяснить сходством патогенетических механизмов и морфологического дефекта, возникающего при заболеваниях этих групп [1, 9, 23]. Известно, что дистрофин и саркогликаны входят в состав дистрофин-гликопротеинового комплекса, посредством которого осуществляется связь цитоскелета миофибрилл с внеклеточным матриксом [25]. Нарушение одного из компонентов этого комплекса приводит к его деградации и некрозу мышечных волокон с последующим замещением их соединительной тканью. Сходство клинических проявлений этих генетически гетерогенных заболеваний осложняет их дифференциальную диагностику и планирование профилактических мероприятий в отягощенных семьях. Это определяет необходимость создания четких алгоритмов диагностики отдельных генетических вариантов псевдогипертрофических форм ПКМД, использование которых позволит избежать ошибок при расчетах риска и формировании заключения о состоянии здоровья будущего ребенка во время проведения

дородовой диагностики. Однако разработка таких алгоритмов невозможна без проведения тщательного генеалогического, клинического, биохимического, молекулярно-генетического и иммуногистохимического обследования больных и членов их семей.

Целью настоящей работы явилось создание алгоритмов дифференциальной диагностики псевдогипертрофических вариантов ПКМД у больных мужского и женского пола.

Материал и методы исследования

Нами проведено комплексное обследование выборки из 123 больных мужского пола и 19 больных женского пола в возрасте от 2,5 до 40 лет с клиническими и электромиографическими признаками псевдогипертрофических ПКМД. Клиническое обследование включало неврологический осмотр по общепринятой в клинической невромиологии методике, сбор анамнестических данных и генеалогический анализ. Электромиографическое обследование проводилось с использованием 4-канального электромиографа. Определение уровня активности креатинфосфокиназы (КФК) проводилось по стандартной методике на автоматическом биохимическом анализаторе. ДНК-диагностика у больных мужского пола осуществлялась методом мультиплексной амплификации с анализом 20 экзонов гена дистрофина и промоторной области. Используемый в настоящее время метод мультиплексной амплификации при проведении молекулярно-генетического ана-

Елена Леонидовна Дадали – профессор, Медико-генетический научный центр РАМН.

Екатерина Владимировна Подагова – канд. мед. наук, педиатрический факультет РГМУ, кафедра детской неврологии.

Сергей Александрович Мальмберг – профессор, педиатрический факультет РГМУ, кафедра детской неврологии.

Александр Борисович Кузнецов – канд. мед. наук, медико-биологический факультет РГМУ, кафедра общей и медицинской генетики.

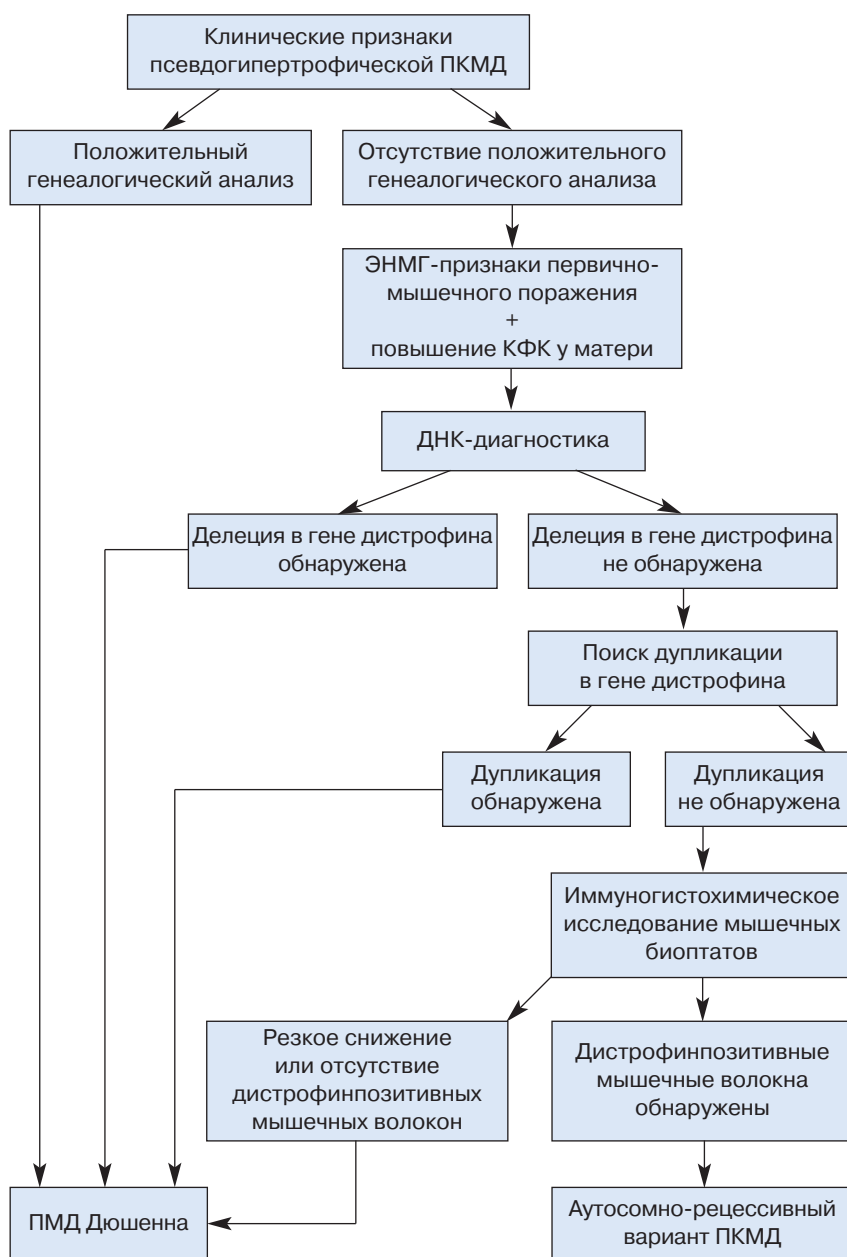


Рис. 1. Алгоритм дифференциальной диагностики псевдогипертрофических ПКМД у лиц мужского пола.

лиза позволяет идентифицировать более 95% всех делеций в гене дистрофина. Больным женского пола проводилось исследование кариотипа с использованием дифференциальной G-окраски по стандартным методикам. Иммуногистохимический анализ биоптатов четырехглавой мышцы проводился с использованием антител, специфичных C-домену, Rod-домену и N-концу белка дистрофина. Мышечный биоптат обрабатывался согласно стандартному иммуногистохимическому протоколу. Для выявления эпителиев

дистрофина использовались антитела DYS-1, DYS-2, DYS-3 "Novocastra" (Великобритания).

Результаты и разработанные алгоритмы

На основании проведенного исследования были определены частоты встречаемости ПМД Дюшенна и псевдогипертрофических вариантов ПКМД с аутосомно-рецессивным типом наследования. Показано, что 96,7% случаев в группе больных мужского пола

приходится на долю ПМД Дюшенна и лишь 3,3% случаев представлено саркогликанопатиями. Полученные результаты соответствуют таковым в других европейских популяциях с низким уровнем инбридинга. В противоположность этому среди больных женского пола у 77,8% больных диагностированы аутосомно-рецессивные саркогликанопатии, а 22,2% женщин являлись гетерозиготными носительницами мутации в гене дистрофина. Известно, что возникновение клинических симптомов у таких носительниц происходит в результате преимущественной инактивации X-хромосомы, не несущей мутантный ген, в мышечных клетках либо в результате количественных перестроек одной из X-хромосом [14, 15]. Полученные нами данные о частотах встречаемости ПМД Дюшенна и саркогликанопатий с аутосомно-рецессивным типом наследования позволили сделать заключение о необходимости первоочередного использования комплекса диагностических методов, направленных на идентификацию ПМД Дюшенна у больных мужского пола с клиническими проявлениями псевдогипертрофических форм ПКМД.

На основании результатов собственных исследований и анализа литературных данных нами предложены алгоритмы дифференциальной диагностики этих групп заболеваний у лиц мужского и женского пола, схематически представленные на рис. 1–3.

Как видно из рис. 1, дифференциальная диагностика различных генетических вариантов псевдогипертрофических ПМД Дюшенна значительно облегчается при наличии информативной родословной, анализ которой позволяет однозначно определить тип наследования заболевания в отягощенной семье (X-сцепленный рецессивный или аутосомно-рецессивный) и установить генотипы родственников пробандов на основании типов образующихся гамет. Основные сложности при дифференциальной диагностике возникают при отсутствии сегрегации заболевания в семье, где пробанд является единственным больным. Одно-

значная диагностика ПМД Дюшенна у больных мужского пола в таких случаях осуществляется на основании обнаружения делеции или дупликации в гене дистрофина. Однако на основании анализа литературных данных и результатов собственных исследований показано, что количество делеционных вариантов ПМД Дюшенна в различных популяциях мира не превышает 70%, дупликационных – 7–10%. Остальные 20–25% случаев ПМД Дюшенна обусловлены точковыми мутациями, поиск которых затруднен в силу значительной протяженности гена дистрофина [2, 7, 20, 22].

Существенное значение в диагностике ПМД Дюшенна в семьях с единственным больным мужского пола имело также определение повышения уровня КФК в плазме крови матерей пробандов, свидетельствующее об их гетерозиготном носительстве мутации в гене дистрофина. Однако проведенные исследования, направленные на анализ этого показателя у облигатных носительниц, позволили сделать заключение о том, что он не является абсолютным диагностическим тестом, так как часть облигатных носительниц имеет нормальные значения уровня КФК [1, 20, 22]. Таким образом, при наличии генеалогических данных, свидетельствующих об X-сцепленной рецессивной сегрегации заболевания, повышении уровня КФК в плазме крови матери пробанда, а также при обнаружении делеции или дупликации в гене дистрофина диагностический этап можно считать завершенным, а диагноз ПМД Дюшенна окончательно установленным.

В том случае, если используемые диагностические методы не позволяют уточнить нозологическую форму псевдогипертрофических ПКМД, необходимым условием дифференциальной диагностики является проведение иммуногистохимического анализа дистрофиновых волокон в биоптате мышечного волокна. При отсутствии или резком снижении количества дистрофинпозитивных волокон в биоптате диагностика ПМД Дюшенна считается окончательной.

Таким образом, в большинстве случаев псевдогипертрофических ПКМД диагностический поиск будет ограничиваться алгоритмом, предложенным на рис. 1. Однако в части случаев (в нашей выборке количество таких больных составляет 3,3%) возникает необходимость продолжения процесса уточнения диагноза на основе идентификации оставшихся четырех генетических вариантов саркогликанопатий. С этой целью нами предложен следующий алгоритм диагностики псевдогипертрофических ПКМД с аутосомно-рецессивным типом наследования (саркогликанопатий), разработанный на основании анализа литературных данных с учетом частот встречаемости различных генетических вариантов этой группы заболеваний. Алгоритм представлен на рис. 2. Установлено, что не менее 50% случаев аутосомно-рецессивных саркогликанопатий представлено вариантом 2D, который обусловлен мутацией в гене α -саркогликана, кодирующем белок адгалин [5, 8, 10–12]. Это определяет необходимость первоочередного исследования указанной мутации в алгоритме ДНК-диагностики. Вторым по частоте генетическим вариантом, на долю которого приходится чуть более 25% всех случаев ПКМД, является ПКМД 2E-типа, причиной которой являются мутации в гене β -саркогликана [6, 13, 21]. Два других генетических варианта ПКМД – 2C- и 2F-типов, обусловленные мутациями в генах γ - и δ -саркогликанов, встречаются в 14 и 2% случаев ПКМД соответственно [16, 21, 24, 26]. Таким образом, при проведении ДНК-анализа необходимо поочередно исключать 4 генетических варианта 2D-, 2E-, 2C-, 2F-типов, следующих аутосомно-рецессивным путем.

По нашему мнению, у больных женского пола, так же как и у больных мужского пола с псевдогипертрофическими ПКМД, дифференциально-диагностический поиск должен начинаться с исключения гетерозиготного носительства мутации в гене дистрофина с последовательным использованием комплекса диагностических

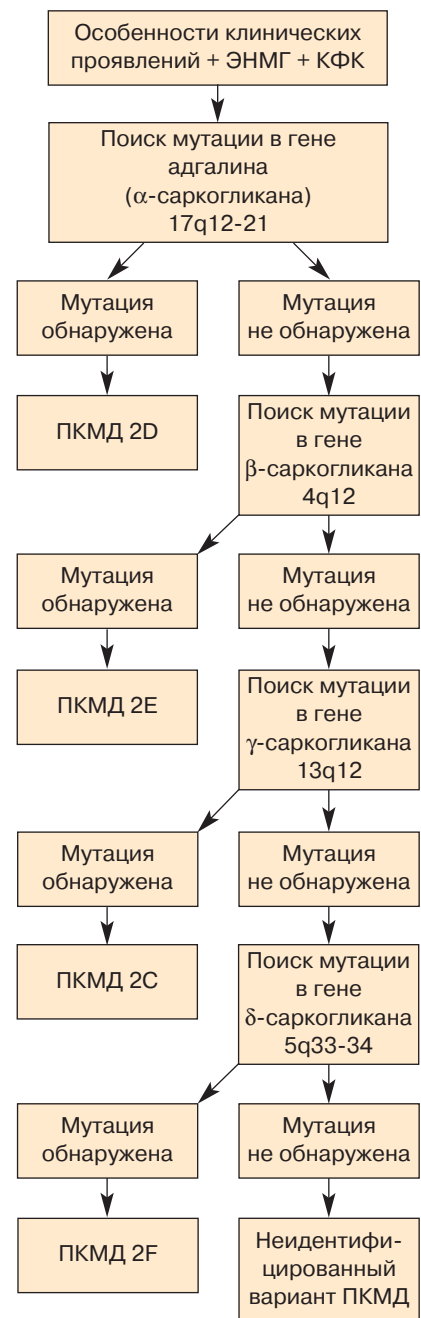


Рис. 2. Дифференциально-диагностический алгоритм аутосомно-рецессивных ПКМД.

методов. Безусловно, носительство мутации в гене дистрофина значительно реже, чем мутации в генах саркогликанов, будет приводить к появлению клинических признаков заболеваний у лиц женского пола. Однако методы, используемые для диагностики ПМД Дюшенна у женщин, просты и экономически менее затратны. Предложенный алгоритм дифференциальной диагностики псевдогипертрофи-

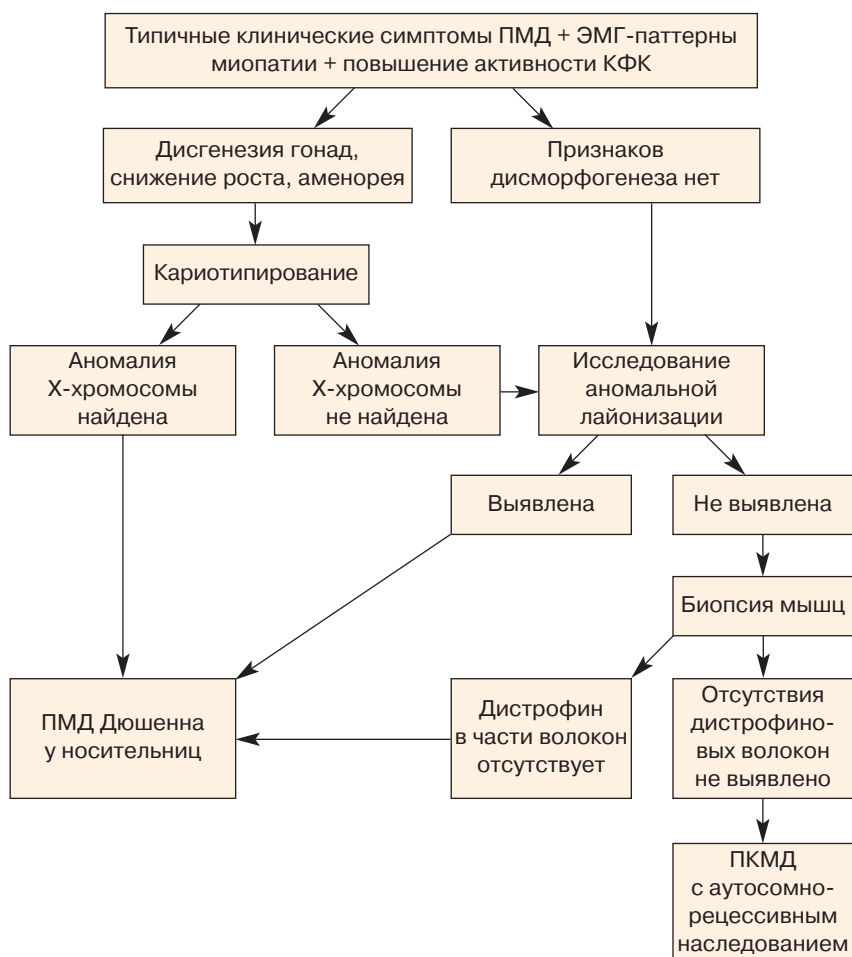


Рис. 3. Алгоритм дифференциальной диагностики различных вариантов псевдогипертрофических ПКМД у лиц женского пола.

ческих вариантов ПКМД у больных женского пола представлен на рис. 3. Однозначная диагностика гетерозиготного носительства мутации в гене дистрофина может быть сделана на основании генеалогического анализа. Облигатное носительство мутации при X-сцепленных рецессивных заболеваниях точно устанавливается в трех случаях: 1) женщина является дочерью больного с X-сцепленным рецессивным заболеванием; 2) у женщины есть больной сын и больной брат; 3) женщина имеет двух больных сыновей. Идентификация саркогликанопатий с аутосомно-рецессивным типом наследования на основе генеалогического анализа однозначно устанавливается при наличии в семье двух больных сибсов женского пола. Если при анализе родословной уточнить тип наследования не удалось, диагностический поиск продолжается. Сначала при кли-

нико-неврологическом исследовании, а затем при кариотипировании исключается один из цитогенетических вариантов синдрома Шерешевского–Тернера, затем проводится анализ на наличие несбалансированной lyonизации одной из X-хромосом в клетках крови, при отсутствии которой появляется необходимость в иммуногистохимическом исследовании биоптатов мышечных волокон. Как и у больных мужского пола, при отсутствии дистрофинпозитивных волокон в части миофибрилл устанавливается гетерозиготное носительство патологической мутации в гене дистрофина – в этом случае делается вывод о том, что клинические проявления обусловлены ПМД Дюшенна.

Предложенные нами алгоритмы дифференциальной диагностики псевдогипертрофических вариантов ПКМД у больных мужского и женского пола

позволяют унифицировать диагностический поиск, уменьшить экономические затраты при проведении обследования больного и повысить эффективность профилактических мероприятий в отягощенных семьях.

Список литературы

1. Дадали Е.Л. Наследственные нервно-мышечные заболевания: диагностика и медико-генетическое консультирование: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. М., 1999.
2. Иллариошкин С.Н. и др. ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование в неврологии. М., 2002.
3. Мальмберг С.А. Наследственные нервно-мышечные заболевания у детей: современные аспекты электрофизиологии, диагностики и лечения: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. М., 2000.
4. Петрухин А.С. Неврология детского возраста. М., 2004.
5. Anastasi G. et al. // Int. J. Mol. Med. 2004. V. 14. P. 989.
6. Balci B. et al. // Acta Myol. 2004. V. 23. P. 154.
7. Calvo F. et al. // Neuromusc. Disord. 2000. V. 10. P. 560.
8. Carrie A. et al. // J. Med. Genet. 1997. V. 34. P. 470.
9. Dincer P. et al. // Neuromusc. Disord. 2004. V. 10. P. 247.
10. Dincer P. et al. // Ann. Neurol. 1997. V. 42. P. 222.
11. Duggan D.J. et al. // New. Eng. J. Med. 1997. V. 336. P. 618.
12. Eiris-Punal J. et al. // Rev. Neurol. 2002. V. 34. P. 486.
13. Fanin M. et al. // Neuromusc. Disord. 2003. V. 13. P. 303.
14. Hiramatsu S. et al. // J. Cardiol. 2000. V. 38. P. 35.
15. Hoogerwaard E.M. et al. // Lancet. 1999. V. 353. P. 2116.
16. Kefi M. et al. // Neuromusc. Disord. 2003. V. 13. P. 779.
17. Matsumura K. // Ryoikibetsu Shokogun Shirizu. 2001. V. 35. P. 88.
18. Nigro V. // Acta Myol. 2003. V. 22. P. 35.
19. Nonaka I. // Rinsho Shinkeigaku. 2004. V. 44. P. 901.
20. Passos-Bueno M.R. et al. // Amer. J. Hum. Genet. 1992. V. 51. P. 1150.
21. Passos-Bueno M.R. et al. // Amer. J. Med. Genet. 1999. V. 82. P. 392.
22. Silbert J.R. et al. // Arch. Dis. Child. 1979. V. 54. P. 534.
23. Sunada Y. // Rinsho Shinkeigaku. 2004. V. 44. P. 995.
24. Todorova A. et al. // Community Genet. 2002. V. 5. P. 217.
25. Vainzof M. et al. // Eur. J. Hum. Genet. 1999. V. 7. P. 251.
26. Zatz M. et al. // Amer. J. Med. Genet. 1989. V. 32. P. 407.