

Изменение спектра выявленных мутаций в гене *DMD* в зависимости от методических возможностей лаборатории

Е.В. Зинина, М.В. Булах, О.П. Рыжкова, О.А. Щагина, А.В. Поляков

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова»; Россия, 115522 Москва, ул. Москворечье, 1

Контакты: Елена Витальевна Зинина zininalen@yandex.ru

Введение. Мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) – тяжелая прогрессирующая форма мышечных дистрофий, проявляющаяся у детей в возрасте от 1 до 3 лет. Заболевание в основном характеризуется слабостью проксимальных мышц, что приводит к затруднениям при движении и в конечном итоге к полной инвалидизации. Мышечная дистрофия Беккера (МДБ) – более мягкая аллельная форма болезни, для которой характерны поздняя манифестация и медленное прогрессирование. Причиной развития МДД/МДБ служат мутации в гене *DMD*, приводящие к дефициту продукции различных изоформ семейства белка дистрофина. Самыми распространенными мутациями при МДД/МДБ являются протяженные делеции (55–65 %) и дупликации (6–11 %) одного или нескольких экзонов. Остальные случаи МДД/МДБ обусловлены точечными мутациями (до 20–30 %). В зависимости от методических возможностей лаборатории менялось представление о спектре мутаций в гене *DMD*, что имеет значение при генетическом консультировании пациентов и планировании доступной в настоящее время терапии.

Цель исследования – анализ спектра мутаций в гене *DMD*, включающий 3 временных отрезка, в зависимости от методических возможностей лаборатории.

Материалы и методы. Проанализирован спектр мутаций в гене *DMD* для выборки из 2957 пациентов, исследованных в лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова» с направляющим диагнозом МДД/МДБ. В зависимости от времени обращения и возможностей лаборатории пациенты были разделены на 3 группы: 2008–2015, 2016–2018 и 2019–2022 гг.

Результаты. В результате проведенного исследования проанализирован полный спектр мутаций в гене *DMD* за 3 временных отрезка, позволяющий получить представление о распределении типов мутаций в выборке среди российских пациентов. Независимо от методических возможностей лаборатории в разные временные периоды спектр мутаций в гене *DMD* остается смещенным относительно мировых данных. В настоящее время наблюдается значительное снижение доли протяженных делеций (50,7–59,6 %), в то время как доли протяженных дупликаций (11,8–17,2 %) и точечных мутаций (23,2–35,0 %) увеличены. Основной причиной таких особенностей спектра, мы предполагаем, являются этнические и популяционные различия.

Выводы. МДД/МДБ – наиболее частые формы мышечных дистрофий, на которые приходится более 50 % всех случаев. Определение спектра мутаций дает понимание об их частотах, что в будущем может помочь пациентам в назначении терапии, специфичной для конкретного типа мутаций.

Ключевые слова: мышечная дистрофия Дюшенна/Беккера, ген *DMD*, спектр мутаций, ДНК-диагностика

Для цитирования: Зинина Е.В., Булах М.В., Рыжкова О.П. и др. Изменение спектра выявленных мутаций в гене *DMD* в зависимости от методических возможностей лаборатории. Нервно-мышечные болезни 2023;13(1):33–43. DOI: 10.17650/2222-8721-2023-13-1-33-43

Change in the spectrum of detected mutations in the *DMD* gene depending on the methodological capabilities of the laboratory

E.V. Zinina, M.V. Bulakh, O.P. Ryzhkova, O.A. Shchagina, A.V. Polyakov

Research Centre for Medical Genetics; 1 Moskvorechye St., Moscow 115522, Russia

Contacts: Elena Vitalyevna Zinina zininalen@yandex.ru

Background. Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a severe, progressive form of muscular dystrophy that occurs in children between one and three years of age. The disease is mainly characterized by weakness of the proximal muscles, which leads to difficulty in movement, and ultimately to complete disability. Becker muscular dystrophy (BMD) is a milder allelic form of the disorder characterized by late onset and slow progression. The cause of the development of DMD/BMD is mutations in the *DMD* gene, leading to a deficiency in the production of various isoforms of the dystrophin protein family. The most common mutations in case of DMD/BMD are gross deletions (55–65 %) and duplications (6–11 %) of one or several exons. The remaining cases of DMD/BMD are due to small mutations (approximately 20–30 %). Depending on the methodological capabilities of the laboratory, the idea of the spectrum of mutations in the *DMD* gene changed, which is important in genetic counseling of patients and planning the therapy available today.

Aim. To analyze the spectrum of mutations in the *DMD* gene, including three time slices, depending on the methodological capabilities of the laboratory.

Materials and methods. We analyzed the spectrum of mutations in the *DMD* gene for a sample of 2957 patients admitted to the laboratory of DNA diagnostics of the Research Centre for Medical Genetics with a referral diagnosis of DMD/BMD. Depending on the time of treatment and the capabilities of the laboratory, patients were divided into three groups: 2008–2015, 2016–2018, 2019–2022.

Results. As a result of the study, the full range of mutations in the *DMD* gene was analyzed over three-time intervals, which makes it possible to get an idea of the distribution of mutation types in the sample among Russian patients. Regardless of the methodological capabilities of the laboratory, the spectrum of mutations in the *DMD* gene remains biased relative to world data. At the moment, there is a significant decrease in the proportion of extended deletions (50.7–59.6 %), while the proportion of extended duplications (11.8–17.2 %) and small mutations (23.2–35.0 %) increased. We assume that the main reason for such features of the spectrum is ethnic and population differences.

Conclusion. Duchenne/Becker muscular dystrophy (DMD/BMD) is the most common form of muscular dystrophy, accounting for more than 50 % of all cases. Determination of the spectrum of mutations provides an understanding of their frequencies, which in the future may help patients in the appointment of therapy specific to a particular type of mutation.

Keywords: Duchenne/Becker muscular dystrophy, gene *DMD*, mutation spectrum, DNA diagnostics

For citation: Zinina E.V., Bulakh M.V., Ryzhkova O.P. et al. Change in the spectrum of detected mutations in the *DMD* gene depending on the methodological capabilities of the laboratory. *Nervno-myshechnye bolezni = Neuromuscular Diseases* 2023;13(1):33–43. (In Russ.). DOI: 10.17650/2222-8721-2023-13-1-33-43

Введение

Мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) — X-сцепленное рецессивное нервно-мышечное заболевание, вызванное мутациями в гене, кодирующем белок дистрофина [1]. К основным проявлениям МДД относят мышечную слабость и задержку моторного развития в раннем возрасте, и уже ко 2-му десятилетию жизни большинство пациентов оказываются полностью прикованы к инвалидному креслу [2]. Кроме того, у пациентов на поздних стадиях болезни часто наблюдаются сердечные и респираторные осложнения, что приводит к ранней смерти [3]. Существует более легкая аллельная форма — мышечная дистрофия Беккера (МДБ), характеризующаяся поздним дебютом и широким диапазоном клинических проявлений. Симптомы могут варьировать от слабости проксимальных мышц, приводящей к потере способности к самостоятельному передвижению, вплоть до таких неспецифических симптомов, как миалгия, тахикардия, одышка и т.п., мало влияющих на двигательную активность до позднего возраста [4].

К причинам развития МДД/МДБ относят патогенные варианты в гене *DMD*. Ген дистрофина является самым протяженным белок-кодирующим геном в геноме человека, размером около 2200 т.н.п., что составляет примерно 0,1 % всего генома. Размер гена *DMD*, а также особенности его структуры (наличие транспозонподобных элементов в интронах) обуславливают

высокую частоту спонтанных мутаций в нем. Мутации в гене *DMD* приводят к полному или частичному прекращению синтеза различных изоформ семейства белка дистрофина — основного структурного белка мышечных клеток [5], который является составляющей частью дистрофин-ассоциированного гликопротеинового комплекса. Данный комплекс обеспечивает структурную поддержку плазматической мембраны и защищает ее от механического перенапряжения вследствие сокращения. При отсутствии функционального дистрофина происходит дестабилизация мембран и, как следствие, повреждение и дегградация мышечных клеток [6].

Впервые ген *DMD* был идентифицирован на X-хромосоме в 1986 г. в лаборатории Льюиса Кункеля [7]. Исследование положило начало проекту по изучению генома человека, поскольку удалось определить хромосомное расположение гена на Хр21. Кроме того, был предложен механизм, объясняющий различия в клинических проявлениях между МДД и МДБ. Для МДД характерен полный дефицит дистрофина вследствие мутаций, нарушающих открытую рамку считывания мРНК, в то время как при МДБ, как правило, обнаруживаются мутации, не приводящие к сдвигу рамки считывания, в результате чего вырабатывается укороченный, но частично функционально активный белок. Также был определен спектр мутаций в гене *DMD*, впоследствии имеющий огромное значение для диагностики заболевания [8].

Первоначально в гене *DMD* были найдены протяженные делеции, затрагивающие от 1 до нескольких экзонов. Доля делеций среди всех пациентов с МДД/МДБ составляла примерно 65 %. Большинство мутаций возможно было обнаружить при помощи стандартного Саузерн-анализа, и основным направлением диагностики являлся поиск наиболее распространенных делеций [9]. В настоящее время делеции также остаются самыми частыми мутациями в гене *DMD*, составляя 55–65 % всех выявленных патогенных вариантов [10]. Вторым этапом развития молекулярно-генетической диагностики МДД/МДБ было появление возможности поиска протяженных дупликаций в гене *DMD* с помощью метода мультиплексной лигазозависимой реакции с последующей амплификацией проб (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA). На долю таких мутаций приходится 6–11 % всех случаев заболевания [11]. Также тогда возникло предположение, что оставшиеся 20–30 % больных МДД/МДБ могут иметь точечные мутации, поиск которых долгое время был затруднен в связи с ограниченными диагностическими возможностями лабораторий. В первую очередь это было связано с тем, что секвенирование по Сэнгеру всей кодирующей последовательности гена дистрофина – долгий, затратный и трудоемкий процесс, который для поиска точечных мутаций в гене *DMD* использовать было нецелесообразно. И только после внедрения методов массового параллельного секвенирования для широкой группы пациентов стало доступно проведение полного анализа последовательности гена *DMD*, за исключением глубоко интронных вариантов.

В связи с расширением методических возможностей лаборатории менялось представление о спектре мутаций в гене *DMD*, что имеет значение при генетическом консультировании пациентов и планировании доступной на сегодняшний день терапии.

Цель настоящего исследования – анализ спектра мутаций в гене *DMD*, включающий 3 временных отрезка, различающихся основными методами, используемыми в тот период для диагностики МДД/МДБ.

Материалы и методы

Исследована группа из образцов ДНК 2957 пациентов, поступивших в лабораторию ДНК-диагностики ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова» с направляющим диагнозом МДД/МДБ. В зависимости от времени обращения и возможностей лаборатории группа была разделена на 3 выборки.

Первой является выборка пациентов ($n = 973$), сформированная до широкого внедрения MLPA в процесс диагностики. Обследование пациентов производилось в 2008–2015 гг. (подгруппа 1). Поиск мутаций заключался в первую очередь в поиске крупных делеций методом мультиплексной амплификации, наиболее часто встречающихся у больных экзонов гена дистрофина.

Вторая выборка включала образцы ДНК 708 пациентов, поступившие на молекулярно-генетическую диагностику в период 2016–2018 гг., когда всем пациентам проводился поиск не только экзонных делеций в «горячих» участках гена, но и делеций и дупликаций всех экзонов с использованием MLPA (подгруппа 2). Кроме того, некоторым пациентам подгрупп 1 и 2 проводился поиск точечных мутаций методом секвенирования по Сэнгеру.

Третья выборка ($n = 1276$) была сформирована уже после внедрения массового параллельного секвенирования (2019–2022 гг.) в диагностику. Пациентам при отрицательном результате MLPA проводился последующий поиск точечных мутаций во всех экзонах и прилегающих интронных областях гена *DMD*. Данные по всем выборкам использовались для определения спектров мутаций в гене *DMD* (подгруппа 3). Медианы возраста установления молекулярного диагноза представлены в табл. 1.

Четвертая выборка включала образцы ДНК плодного материала, поступавшего в лабораторию на диагностику в период 2008–2015 гг. В этот период пренатальная диагностика в первую очередь была направлена на выявление протяженных делеций и осуществлялась доступными на тот момент методами. Всего было проанализировано 78 плодов.

Часть пациентов 1-й и 2-й выборок при неустановленном молекулярном диагнозе повторно обращались в ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова» для проведения ДНК-диагностики, данный реанализ осуществлялся методами, доступными на момент повторного обращения.

Забор биологического материала проводился в лабораторных кабинетах медико-генетических консультаций и лечебно-профилактических учреждений разных регионов РФ. От всех пациентов получено информированное согласие на проведение исследования, а в случае несовершеннолетних пациентов – от их родителей или законных представителей. Для исследования использовали цельную венозную кровь, собранную в одноразовые пластиковые пробирки с консервантом (ЭДТА). Выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови выполняли с помощью готового набора реактивов для выделения Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, США) по протоколу производителя [12].

Для выборки больных из подгруппы 1 поиск делеций осуществлялся при помощи мультиплексной амплификации, позволяющей одновременно амплифицировать несколько фрагментов разной длины, наличие или отсутствие которых регистрировалось с помощью электрофореза. Первоначально мультиплексную реакцию проводили с использованием 20 пар олигопраймеров (экзоны 3, 4, 6, 8, 13, 17, 19, 32, 42, 43, 44, 45, 47, 48, 50, 51, 52, 53 и 60, а также промотор гена *DMD*). Таким же методом проводилась и дородовая диагностика в данный временной период. Поиск точечных

Таблица 1. Медианы возраста установления молекулярного диагноза мышечной дистрофии Дюшенна/Беккера в разные временные периоды по типам мутаций

Table 1. Median age at molecular diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy in different time periods by mutation type

Тип мутации Type of mutation	2008–2015 (n = 466)	2016–2018 (n = 500)	2019–2022 (n = 871)
Делеции Deletions	7 лет 7 years	7 лет 7 years	7 лет 7 years
Дупликации Duplications	7 лет 7 years	6 лет 5 мес 6 years 5 months	8 лет 8 years
Точечные мутации Point mutations	7 лет 7 years	6 лет 6 years	8 лет 8 years

мутаций в некоторых случаях проводился секвенированием по Сэнгеру кодирующих экзонных и прилегающих интронных последовательностей гена *DMD*.

Для пациентов подгрупп 2 и 3 проводился поиск протяженных делеций и дупликаций 1 или нескольких экзонов гена *DMD* при помощи MLPA с использованием коммерчески доступных наборов (MLPA SALSA P034 и P035 *DMD* probemix, MRC-Holland, Нидерланды). Реакции проводились в соответствии с рекомендациями производителя [13]. Продукт реакции детектировался методом фрагментарного анализа на приборе ABI Prism 3130 (Applied Biosystems). Анализ данных проводился с использованием программного обеспечения Coffalyser.Net™. В случае делеции 1 экзона проводили подтверждение результата с помощью полимеразной цепной реакции согласно данным ранее рекомендациям [14].

Далее для пациентов подгруппы 3 проводился поиск точечных мутаций с использованием кастомной NGS-панели, включающей 31 ген поясно-конечностных мышечных дистрофий. Данная панель позволяет анализировать кодирующие последовательности и экзон-интронные области гена *DMD*, а также генов, ассоциированных с генетическими формами поясно-конечностных мышечных дистрофий разных типов (*CAPN3*, *EMD*, *SGCG*, *SGCA*, *SGCB*, *SGCD*, *TCAP*, *FKRP*, *POMT1*, *POMT2*, *ANO5*, *FKTN*, *ISPD*, *LMNA*, *CAV3*, *DAG1*, *POPDC3*, *FHL1*, *GAA*, *PLEC*, *POMGNT1*, *POMGNT2*, *GMPPB*, *HNRNPDL*, *GNE*, *FKBP14*, *DYSF*, *DNAJB6*, *BVES*, *TRIM32*). Панельное секвенирование проводили на секвенаторе нового поколения Ion S5 (Thermo Fisher Scientific, США).

Для наименования выявленных вариантов использовалась номенклатура, представленная на сайте <http://varnomen.hgvs.org/recommendations/DNA>, v.20.05 [15]. Обработка данных секвенирования проведена с использованием программного обеспечения ngs-data.ru [16]. Для оценки популяционных частот выявленных вариантов использованы выборки проектов «1000 геномов» и Genome Aggregation Database (gnomAD v.2.1.1). Для оценки клинической релевантности выявленных

вариантов использованы база данных OMIM, база данных по патогенным вариантам HGMD® Professional v.2021.4, специализированная база данных LOVD (<https://databases.lovd.nl/shared/genes/DMD>) и «Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS)» [17].

Результаты

В результате исследования ДНК 973 неродственных пробандов (выборка до внедрения MLPA и массового параллельного секвенирования – 2008–2015 гг. – подгруппа 1) с направляющим диагнозом МДД/МДБ диагноз был подтвержден молекулярно-генетическими методами у 466 (48 %) из 973 больных (рис. 1). Среди всех 973 обследованных 399 (41 %) имели протяженные делеции, 55 (6 %) – протяженные дупликации. У 507 (52 %) обратившихся пациентов мы не смогли идентифицировать причинные варианты, связанные с болезнью. Часть неподтвержденных случаев была обусловлена тем, что первоначально диагностика была направлена на поиск только протяженных делеций, причем не во всем гене, а в участках, наиболее подверженных крупным перестройкам.

С 2016 г. в России в диагностическую практику вошла MLPA, позволяющая провести количественный анализ. Впервые этот метод в диагностике МДД был использован в 2004 г. и с тех пор остается «золотым стандартом» для скрининга крупных делеций/дупликаций гена *DMD* у пациентов мужского пола, а также у женщин-носительниц во всем мире [18, 19]. Среди 708 исследованных пациентов мужского пола подгруппы 2 у 500 (71 %) была выявлена молекулярная причина заболевания. На рис. 2 показано распределение типов мутаций у российских пациентов с МДД/МДБ, поступивших на диагностику в 2016–2018 гг. Протяженные делеции и дупликации были выявлены у 298 (42 %) и 86 (12 %) пациентов соответственно. Доля точечных мутаций составила 17 % (116 пациентов из 708). Также необходимо отметить, что с расширением возможностей лаборатории число неподтвержденных случаев уменьшилось практически

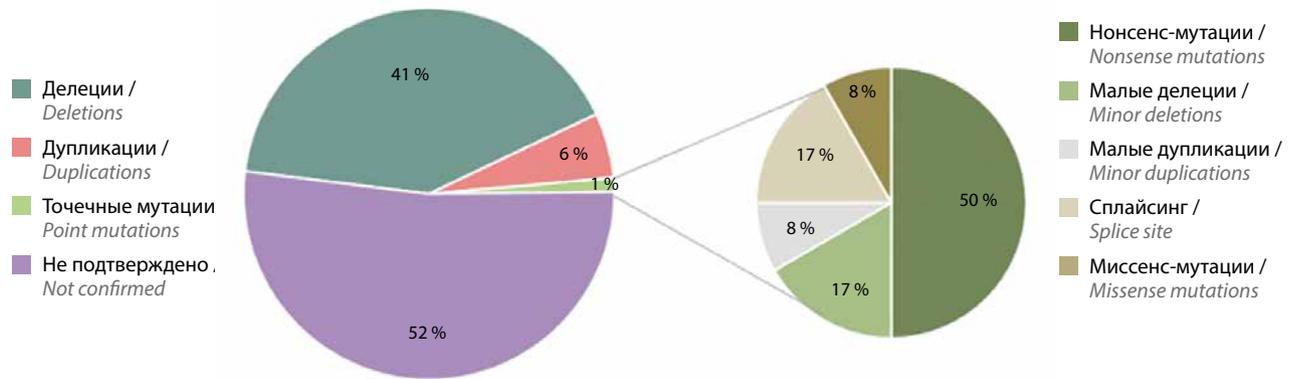


Рис. 1. Спектр мутаций в гене DMD у российских пациентов, поступивших на диагностику в 2008–2015 гг.

Fig. 1. Mutation spectrum of the DMD gene in Russian patients admitted for diagnostics in 2008–2015

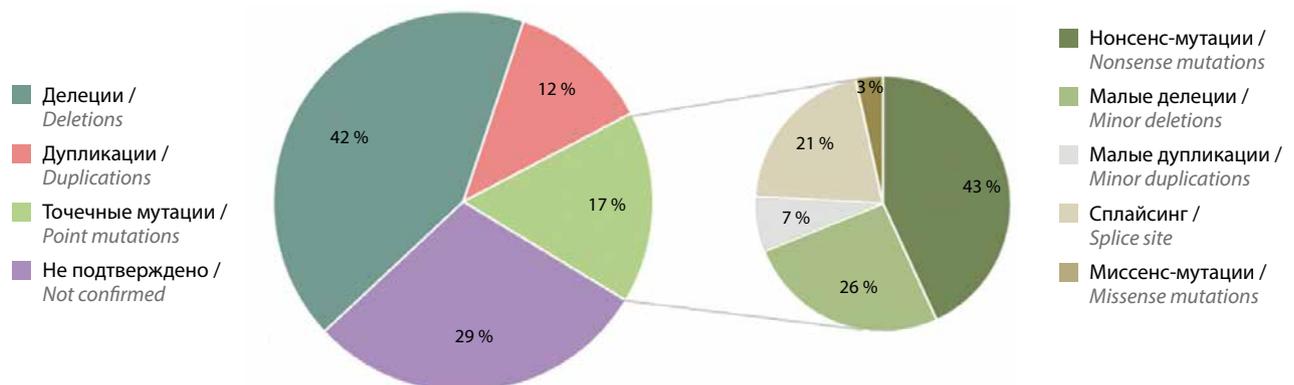


Рис. 2. Спектр мутаций в гене DMD у российских пациентов, поступивших на диагностику в 2016–2018 гг.

Fig. 2. Mutation spectrum of the DMD gene in Russian patients admitted for diagnostics in 2016–2018

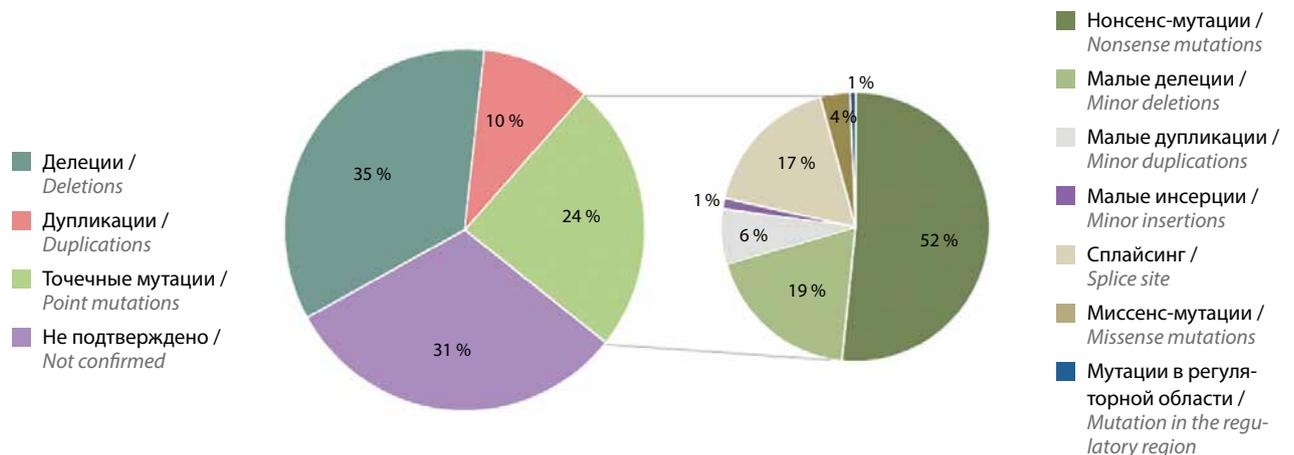


Рис. 3. Спектр мутаций в гене DMD у российских пациентов, поступивших на диагностику в 2019–2022 гг.

Fig. 3. Mutation spectrum of the DMD gene in Russian patients admitted for diagnostics in 2019–2022

в 1,8 раза относительно подгруппы 1 – 29 % (208 из 708) против 52 %.

Для пациентов подгруппы 3 также был проведен анализ спектра мутаций в гене DMD (рис. 3). В исследуемой выборке из 1276 пациентов у 869 (68,6 %) были найдены варианты в гене DMD, доля делеций составила 35 % (441 пациент), дупликаций – 10 % (124 пациента), точечных мутаций – 24 % (304 пациента). По срав-

нению с подгруппой 2 доля пациентов, у которых не было найдено вариантов в гене DMD, изменилась незначительно и составила 31 % (396 из 1276). Кроме того, необходимо отметить, что у 7 % (91 из 1276) пациентов были найдены варианты в других генах, ответственных за развитие различных форм пояснично-конечностных мышечных дистрофий, благодаря таргетной панели, состоящей из 31 гена.

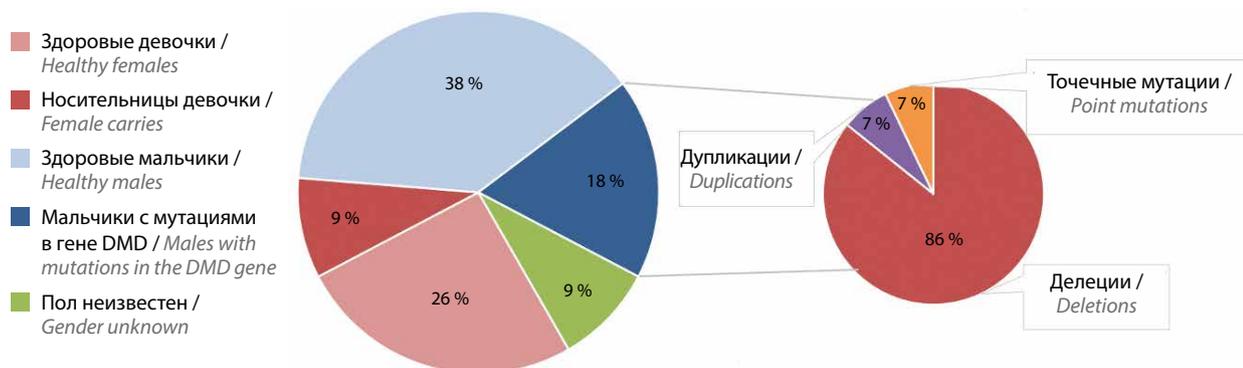


Рис. 4. Результаты пренатальной диагностики в период 2008–2015 гг.

Fig. 4. Results of prenatal diagnosis in the period 2008–2015

По результатам исследования был проанализирован спектр точечных мутаций в гене *DMD* за 3 временных периода. В 2008–2015 гг. у пациентов из подгруппы 1 обнаружение точечных мутаций было затруднено из-за большой протяженности гена. Кроме того, согласно данным литературы, «горячие регионы» точечных мутаций не были идентифицированы, и варианты могли возникать в любой области гена [20]. Начиная с 2016 г. данный метод был внедрен в диагностику МДЦ/МДБ, в результате чего у 24 % (304 из 1276) пациентов (подгруппа 3) были обнаружены точечные мутации. Среди всех обнаруженных точечных мутаций в исследуемой выборке вне зависимости от временного периода наблюдалась большая доля нонсенс-мутаций (43–52 % всех малых мутаций). Также были выявлены мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания (малые делеции, дупликации, инсерции) (5,3–6,0 %), мутации сайтов сплайсинга (3,4–4,2 %) и миссенс-мутации (0,6–0,9 %).

Также для 4-й подгруппы в ходе проведенной работы был проанализирован спектр мутаций гена *DMD* среди плодов мужского пола, что позволило оценить направленность пренатальной диагностики в период 2008–2015 гг. и ее влияние на спектр мутаций в целом (рис. 4).

Как следует из рис. 4, за все время проведенной пренатальной диагностики доля плодов мужского пола с патогенными вариантами в гене *DMD* составила 18 % (14 из 78), среди которых большинство имели протяженные делеции (86 %; 12 из 14). У 7 % (1 из 14) были обнаружены протяженные дупликации, и у 7 % (1 из 14) – точечные варианты.

Обсуждение

Среди пациентов с подтвержденным молекулярно-генетическими методами диагнозом МДЦ/МДБ был проанализирован спектр мутаций в гене *DMD*. В подгруппе 1 диагноз был подтвержден у 48 % (466 из 973). Среди обследованных пациентов подгруппы 2 у 71 % (500 из 708) были обнаружены варианты в гене *DMD*, а среди обра-

тившихся из подгруппы 3 – у 68,6 % (869 из 1276). Суммарно у 1835/2957 (62 %) больных мужского пола была найдена молекулярная причина заболевания. В табл. 2 приведены сводные данные по 3 выборкам. Необходимо отметить, что с расширением методических возможностей лаборатории спектр менялся: доля делеций снижалась (с 85,6 до 50,7 %), в то время как доля точечных мутаций значительно увеличилась (с 2,6 до 35,0 %). При сопоставлении спектра мутаций в гене *DMD* с данными, представленными базой данной TREAT-NMD, видно, что протяженные делеции и дупликации являются наиболее частыми мутациями, особенно в период с 2008 по 2018 г., до внедрения в практику массового параллельного секвенирования. Также при сравнении спектра мутаций с мультиэтнической выборкой было обнаружено, что количество протяженных дупликаций больше среди российских пациентов, в то время как протяженных делеций меньше вне зависимости от периода и возможностей лаборатории, за исключением раннего периода, когда диагностика была преимущественно направлена на выявление делеций. Кроме того, за период с 2019 г. по настоящее время (подгруппа 3) возросла доля точечных мутаций (35,0 %; 304 из 869) относительно 20,5 %, представленных в мировой выборке [21].

Учитывая наличие доступных и эффективных методов терапии МДЦ/МДБ, идентификация типа мутаций необходима для точного диагноза, прогноза и индивидуального лечения пациентов, а также для медико-генетического консультирования их семей в дальнейшем. Ретроспективный характер исследования позволяет проанализировать спектр мутаций больных МДЦ/МДБ, поступающих на диагностику в разные годы. Благодаря этому было выявлено, что в изученной выборке наблюдается смещенный относительно мировых данных мутационный спектр. В первую очередь необходимо обратить внимание на то, что в исследуемой выборке количество протяженных делеций значительно меньше, в то время как крупных дупликаций и точечных мутаций представлено больше (см. табл. 2).

Таблица 2. Сравнение спектров мутаций гена DMD в разные временные периоды у больных мышечной дистрофией Дюшенна/Беккера
Table 2. Comparison of various DMD mutation rates in Duchenne/Becker muscular dystrophy patients at different time periods

Тип мутации Type of mutation	2008–2015 (n = 466), N (%)	2016–2018 (n = 500), N (%)	2019–2022 (n = 869), N (%)	Всего (n = 1835), N (%) All (n = 1835), N (%)	2018–2022 гг. рождения (n = 91), N (%) 2018–2022 yy of birth (n = 91), N (%)	TREAT-NMD [21] (n = 7145), N (%)	K. Kong et al. [22] (n = 1028), N (%) X. Kong et al. [22] (n = 1028), N (%)	M. Neri et al. [23] (n = 1902)*, N (%)
Делеции Deletions	399 (85,6 %)	298 (59,6 %)	441 (50,7 %)	1138 (62,0 %)	45 (49,5 %)	4894 (68,5 %)	740 (72,0 %)	65,2 %
Дупликации Duplications	55 (11,8 %)	86 (17,2 %)	124 (14,3 %)	265 (14,4 %)	13 (14,3 %)	784 (11,0 %)	87 (8,4 %)	9,9 %
Все точечные мутации All point mutations	12 (2,6 %)	116 (23,2 %)	304 (35,0 %)	432 (23,5 %)	33 (36,2 %)	1467 (20,6 %)	201 (19,6 %)	24,7 %
Нонсенс-мутации Nonsense mutations	6 (1,4 %)	50 (10,0 %)	158 (18,2 %)	214 (11,6 %)	23 (25,3 %)	726 (10,2 %)	101 (9,8 %)	10,5 %
Точечные мутации со сдвигом рамки считывания Point mutations, frameshift	3 (0,6 %)	38 (7,6 %)	77 (8,8 %)	118 (6,4 %)	5 (5,5 %)	490 (6,9 %)	58 (5,6 %)	7,3 %
Точечные мутации без сдвига рамки считывания Point mutations, in-frame	—	—	5 (0,6 %)	5 (0,3 %)	—	—	—	—
Сплайсинг Splice site	2 (0,4 %)	24 (4,8 %)	53 (6,1 %)	79 (4,3 %)	4 (4,4 %)	199 (2,8 %)	29 (2,8 %)	4,6 %
Миссенс-мутации Missense mutations	1 (0,2 %)	4 (0,8 %)	9 (1,1 %)	14 (0,8 %)	1 (1,0 %)	30 (0,4 %)	13 (1,4 %)	2,0 %
Интронные мутации Intronic mutations	—	—	2 (0,2 %)	2 (0,1 %)	—	22 (0,3 %)	—	—

Примечание. N — число больных с подтвержденным молекулярным диагнозом.

* Исследователи не приводят точное число больных с определенным типом мутаций, только доли типов мутаций.

Note. N — number of patients with confirmed molecular diagnosis.

* Researchers do not give the exact number of patients with a particular type of mutation, only the proportion of mutation types.

При этом такие изменения в спектре наблюдаются в разные временные периоды, вне зависимости от методических возможностей лаборатории. Различия количества делеций относительно представленных в мире 60 % [24] было отмечено еще в 1997 г. А.Л. Чухровой в диссертационной работе «Анализ мутаций в гене дистрофина». Доля найденных делеций в проведенной работе составила 42 %, что не противоречит сведениям в настоящем исследовании. В настоящее время обнаруженное снижение доли выявляемых делеций по сравнению с мировыми выборками объяснить достаточно сложно.

Впервые данные о спектре мутаций в мультиэтнической выборке, на которую мы ссылаемся при сравнении, были собраны благодаря глобальной базе данных TREAT-NMD DMD в 2013 г. Данные загружались из национальных реестров (более 20 стран), и сегодня это самая большая когорта пациентов с подтвержденным диагнозом МДД/МДБ, которая была создана для сбора и сравнения типов мутаций [25]. Но так как выборка формировалась долгое время, а исторически обнаружение делеций и дупликаций было проще, возможно, существует систематическая ошибка зарегистрированных мутаций, и в выборке может наблюдаться сдвиг в пользу протяженных делеций, аналогичный полученному нами в подгруппе 1 (период обращения 2008–2015 гг.). Однако исследователи утверждают, что такой проблемы нет благодаря современным широкодоступным диагностическим методам во многих странах мира, а их ранние данные – это только наиболее часто встречающиеся мутации [21]. Но при сопоставлении суммарных данных за все годы диагностики МДД/МДБ в РФ, вне зависимости от доступных методов, с мультиэтнической выборкой результаты практически идентичны: доля делеций составляет 62,0 %, дупликаций – 14,5 %, точечных мутаций – 23,5 %, в то время как в мировой выборке – 68,5; 11,0 и 20,6 % соответственно. Поэтому можно предположить, что в выборке базы данных TREAT-NMD также имеется смещение спектра. Это обусловлено тем, что выборка может включать пациентов того периода, когда молекулярная диагностика была направлена только на выявление делеций, как в нашем случае. В связи с этим мы сравнили спектр мутаций в РФ со спектрами, представленными Китаем [22] и Италией [23], выборки которых формировались после 2018 г. И также были выявлены различия в спектре в РФ, такие как сниженное число делеций относительно представленных 72,0 и 65,2 % и повышенные доли дупликаций и точечных мутаций.

Мы предполагаем 3 возможные причины различий спектра мутаций: направленность пренатальной ДНК-диагностики в 1990–2000 гг. на выявление только протяженных делеций (это могло привести к снижению доли больных мальчиков с делециями), предвзятость отбора пациентов (в поле зрения врачей попадают в первую очередь самые тяжелые пациенты, и доля

мальчиков с делециями, не приводящими к сдвигу рамки считывания, может быть занижена) и различия в структуре гена *DMD* (например, в изученной выборке интроны гена могут содержать меньшее число мобильных элементов генома) в различных популяциях.

Длительное время до развития таких современных методов диагностики, как MLPA и NGS-секвенирование, пренатальная ДНК-диагностика была направлена на выявление только протяженных делеций методом мультиплексного анализа, который позволял обнаружить до 10 разных экзонов в 1 реакции. Использование этого метода в РФ могло выявить делецию в 19 экзонах и промоторе дистрофина. Согласно данным литературы, по крайней мере 1 из этих экзонов отсутствует более чем в 95 % делеций [26]. Данный метод использовался для пренатальной диагностики в том случае, если в семье у больного МДД/МДБ известна делеция. Также дородовая диагностика проводилась с помощью анализа полиморфизма длины рестрикционных фрагментов, который помимо всего позволял определить статус носительства у матери. Такой косвенный метод ДНК-диагностики информативен в 79 % случаев [27]. Поэтому было предположено, что именно благодаря пренатальной диагностике, которая длительный промежуток времени была направлена только на выявление делеций, произошло смещение спектра мутаций в гене *DMD* в пользу дупликаций и точечных мутаций. В связи с этим мы проанализировали результаты пренатальной диагностики, проведенной в лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова» в период 2008–2015 гг. (см. рис. 4).

Как следует из рис. 4, за все время проведения пренатальной диагностики число плодов мужского пола с патогенными вариантами в гене *DMD* составило 18 % (14 из 78), среди которых большинство имели протяженную делецию (86 %; 12 из 14). Таким образом, проведение дородовой диагностики, направленной на выявление преимущественно делеций, не могло существенно повлиять на спектр мутаций, поскольку число больных плодов с делециями (12) относительно всей выборки больных весьма мало.

Второе возможное объяснение различий в спектре мутаций состоит в том, что долгое время ДНК-диагностика МДД/МДБ в РФ заключалась только в поиске протяженных делеций. Таким образом, определенная доля пациентов оставалась без подтвержденного молекулярно-генетическими методами диагноза. Только после 2015 г., с появлением в практике методов MLPA и массового параллельного секвенирования возросло число пациентов с протяженными дупликациями и точечными мутациями. В результате этого произошло изменение спектра в сторону точечных мутаций, так как большинство пациентов с делециями в РФ были продиагностированы ранее и повторно не поступали. Соответственно, в 3-й выборке следует ожидать большую долю пациентов более старшего возраста с подтвержденными

точечными мутациями. В табл. 1 представлены медианы возраста установления молекулярного диагноза МДД/МДБ в выборках в разные временные периоды по типам мутаций. Медианный возраст пациентов составил 6–8 лет. Таким образом, отбор пациентов в какой-то степени мог влиять на смещение спектра, но незначительно, так как отличие по медиане возрастов отмечается не более чем на 1 год.

Кроме того, для проверки истинности снижения доли делеций в изученной выборке в исследовании был проанализирован спектр мутаций в гене *DMD* среди пациентов 2018–2022 г.р. с подтвержденным диагнозом МДД/МДБ, которые впервые обратились за молекулярно-генетической диагностикой (3,1 %; 91 из 2957). Среди этой группы на долю делеций приходится 49,6 % (45 из 91), дупликаций – 14,3 % (13 из 91), точечных мутаций – 36,2 % (33 из 91). Из полученных результатов можно сделать вывод о том, что различие в спектре мутаций никак не связано с процессом отбора пациентов в исследование, и доля экзонных делеций в гене дистрофина в изученной выборке объективно составляет около 50 %.

Возможные различия в структуре гена *DMD* в различных популяциях мира пока полностью не исследованы. Ранее С. Sun и соавт. было высказано предположение о том, что частота мутаций варьирует в зависимости от этнической группы. Исследователями также были проанализированы данные, представленные выборками различных стран (китайская, испанская и итальянская), и отмечены изменения в спектрах мутаций среди различных популяций. Примечательно то, что протяженные делеции являются наиболее распространенным типом мутаций в мире (64–88 %) [28]. Кроме того, ранее итальянскими учеными были представлены данные, свидетельствующие о различиях в распределении мутаций в зависимости от географии и места рождения пациентов с МДД/МДБ, что подчеркивает существование этнических различий [23].

Отличия в спектре наблюдались и в выборках, представленных США [20] и Японией [29]. Доля делеций в американской выборке была значительно снижена относительно мировых данных и составляла 42,9 %, что можно соотнести с данными РФ. Основным объяснением такого изменения доли делеций в США служили особенности отбора пациентов [20]. Как показано нами, процесс отбора пациентов в проведенном исследовании не влиял на спектр мутаций. Кроме того, ранее G. Zamani и соавт. было проведено сравнение долей делеций в гене *DMD* среди разных популяций.

Частота делеций сильно варьировала. Например, доля делеций в европейских странах оценивается в 60–80 %, в то время как в азиатских странах диапазон их частоты выше (28–80 %) [30]. В выборке, представленной Японией, так же как и в настоящем исследовании, доля точечных мутаций составила около 30 %, что больше среднего показателя по миру, составляющего 20 %. В первую очередь такое изменение спектра объяснялось подходом к диагностике в Японии – анализ мРНК позволял обнаружить многие пропущенные малые мутации, а также интронные варианты. Но исследователи не отвергают и влияние этнических различий в мутагенных факторах и особенностей структуры хроматина на спектр мутаций [29]. И именно поэтому в настоящее время этнические особенности остаются наиболее вероятным объяснением наличия различий в спектре мутаций в исследуемых выборках по всему миру.

Выводы

Точная характеристика типа мутаций при МДД/МДБ, а также точные методы диагностики крайне важны для генетического консультирования пациентов и применения персонализированной медицины в настоящем и ближайшем будущем. Метод мультиплексной полимеразной цепной реакции долгое время являлся «золотым стандартом» диагностики МДД/МДБ. Однако у метода были свои ограничения, такие как невозможность определить точные границы делеции и обнаружить дупликации. Появление уже MLPA и NGS-секвенирования дало возможность изучить ген полностью, в связи с чем большинству пациентов был установлен молекулярно-генетический диагноз.

В результате проведенного исследования был проанализирован полный спектр мутаций в гене *DMD* за 3 временных отрезка, позволяющий получить представление о распределении типов мутаций в выборке среди российских пациентов. Вне зависимости от методических возможностей лаборатории спектр мутаций в гене *DMD* остается смещенным относительно мировых данных. В настоящее время наблюдается значительное снижение доли протяженных делеций (50,7–59,6 %), в то время как доли протяженных дупликаций (14,3–17,2 %) и малых мутаций (23,2–35,0 %) увеличены. Основной причиной таких особенностей спектра, как мы предполагаем, являются этнические и популяционные различия. Таким образом, определение спектра мутаций дает понимание об их частотах, что в будущем может помочь пациентам в назначении терапии, специфичной для конкретного типа мутаций.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Arora H. Duchenne muscular dystrophy: still an incurable disease. *Neurol Ind* 2019;67(3):717–23. DOI: 10.4103/0028-3886.263203
- Sinha R., Sarkar S., Khaitan T., Dutta S. Duchenne muscular dystrophy: case report and review. *J Family Med Prim Care* 2017;6(3):654. DOI: 10.4103/2249-4863.222015
- Duan D., Goemans N., Takeda S. et al. Duchenne muscular dystrophy. *Nat Rev Dis Primers* 2021;7(1):13. DOI: 10.1038/s41572-021-00248-3
- Waldrup M.A., Flanigan K.M. Update in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Cur Opin Neurol* 2019;32(5):722–7. DOI: 10.1097/WCO.0000000000000739
- Iskandar K., Dwianingsih E.K., Pratiwi L. et al. The analysis of *DMD* gene deletions by multiplex PCR in Indonesian DMD/BMD patients: the era of personalized medicine. *BMC Res Notes* 2019;12(1):704. DOI: 10.1186/s13104-019-4730-1
- Blake D.J., Weir A., Newey S.E., Davies K.E. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev* 2002;82(2):291–329. DOI: 10.1152/physrev.00028.2001
- Koenig M., Hoffman E.P., Bertelson C.J. et al. Complete cloning of the duchenne muscular dystrophy (*DMD*) cDNA and preliminary genomic organization of the *DMD* gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987;50(3):509–17. DOI: 10.1016/0092-8674(87)90504-6
- Chamberlain J.R., Chamberlain J.S. Progress toward gene therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther* 2017;25(5):1125–31. DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.02.019
- Beggs A.H., Kunkel L.M. Improved diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy. *J Clin Invest* 1990;85(3):613–9. DOI: 10.1172/JCI114482
- Falzarano M., Scotton C., Passarelli C., Ferlini A. Duchenne muscular dystrophy: from diagnosis to therapy. *Molecules* 2015;20(10):18168–84. DOI: 10.3390/molecules201018168
- Hu X.Y., Ray P.N., Murphy E.G. et al. Duplicational mutation at the Duchenne muscular dystrophy locus: its frequency, distribution, origin, and phenotype/genotype correlation. *Am J Hum Genet* 1990;46(4):682–95.
- Wizard® Genomic DNA Purification Kit. Available at: https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protcards/wizard-genomic-dna-purification-kit-quick-protocol.pdf?rev=4cc2e14ff84c4281a97eb50b32755c33&sc_lang=en.
- MRC Holland: Confidence in Copy Number Determination. Available at: <https://www.mrcholland.com>.
- Fratte C., Dagleish R., Allen S.K. et al. EMQN best practice guidelines for genetic testing in dystrophinopathies. *Eur J Hum Genet* 2020;28(9):1141–59. DOI: 10.1038/s41431-020-0643-7
- Sequence Variant Nomenclature. Available at: <http://varnomen.hgvs.org>.
- NGSDData. Available at: https://new.fips.ru/registers-doc-view/fips_servlet?DB=EVM&DocNumber=2021614055&TypeFile=html.
- Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б. и др. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2). Медицинская генетика 2019;18(2):3–24. DOI: 10.25557/2073-7998.2019.02.3-2318
- Ryzhkova O.P., Kardymon O.L., Prohorchuk E.B. et al. Guidelines for the interpretation of massive parallel sequencing variants (update 2018, v.2). *Meditinskaya genetika = Medical Genetics* 2019;18(2):3–24. (In Russ.). DOI: 10.25557/2073-7998.2019.02.3-2318
- Schwartz M., Dunø M. Improved molecular diagnosis of dystrophin gene mutations using the multiplex ligation-dependent probe amplification method. *Genet Test* 2004;8(4):361–7. DOI: 10.1089/gte.2004.8.361
- Ji X., Zhang J., Xu Y. et al. MLPA application in clinical diagnosis of DMD/BMD in Shanghai: MLPA application in clinical diagnosis of DMB/BMD. *J Clin Lab Anal* 2015;29(5):405–11. DOI: 10.1002/jcla.21787
- Flanigan K.M., Dunn D.M., von Niederhausern A. et al. Mutational spectrum of *DMD* mutations in dystrophinopathy patients: application of modern diagnostic techniques to a large cohort. *Hum Mutat* 2009;30(12):1657–66. DOI: 10.1002/humu.21114
- Bladen C.L., Salgado D., Monges S. et al. The TREAT-NMD DMD Global Database: analysis of more than 7,000 Duchenne muscular dystrophy mutations. *Hum Mut* 2015;36(4):395–402. DOI: 10.1002/humu.22758
- Kong X., Zhong X., Liu L. et al. Genetic analysis of 1051 Chinese families with Duchenne/Becker muscular dystrophy. *BMC Med Genet* 2019;20(1):139–45. DOI: 10.1186/s12881-019-0873-0
- Neri M., Rossi R., TrabANELLI C. et al. The genetic landscape of dystrophin mutations in Italy: a nationwide study. *Front Genet* 2020;11:131. DOI: 10.3389/fgene.2020.00131
- Okubo M., Minami N., Goto K. et al. Genetic diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy using next-generation sequencing: validation analysis of *DMD* mutations. *J Hum Genet* 2016;61(6):483–9. DOI: 10.1038/jhg.2016.7
- Bushby K., Lynn S., Straub T. Collaborating to bring new therapies to the patient – the TREAT-NMD model. *Acta Myol* 2009;28(1):12–5.
- Dunnen J.T., Beggs A.H. Multiplex PCR for identifying *DMD* gene deletions. *Curr Protoc Hum Genet* 2006;49(1). DOI: 10.1002/0471142905.hg0903s49
- Gilberto F., Ferreiro V., Massot F. et al. Prenatal diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy by short tandem repeat segregation analysis in argentine families: DMD molecular prenatal diagnosis. *Muscle Nerve* 2011;43(4):510–17. DOI: 10.1002/mus.21904
- Sun C., Shen L., Zhang Z., Xie X. Therapeutic strategies for Duchenne muscular dystrophy: an update. *Genes* 2020;11(8):837. DOI: 10.3390/genes11080837
- Takeshima Y., Yagi M., Okizuka Y. et al. Mutation spectrum of the dystrophin gene in 442 Duchenne/Becker muscular dystrophy cases from one Japanese referral center. *J Hum Genet* 2010;55(6):379–88. DOI: 10.1038/jhg.2010.49
- Zamani G., Bereshneh A.H., Malamiri A.R. et al. The first comprehensive cohort of the Duchenne muscular dystrophy in Iranian population: mutation spectrum of 314 patients and identifying two novel nonsense mutations. *J Mol Neurosci* 2020;70(10):1565–73. DOI: 10.1007/s12031-020-01594-9

Вклад авторов

А.В. Поляков, О.А. Шагина, О.П. Рыжкова: разработка дизайна исследования, разработка концепции исследования, редактирование статьи;

Е.В. Зинина, М.В. Булах: проведение лабораторной молекулярно-генетической диагностики, обработка материала, анализ полученных данных, написание и редактирование статьи.

Authors' contributions

A.V. Polyakov, O.A. Shchagina, O.P. Ryzhkova: study design development, development of the research concept, editing the article;

E.V. Zinina, M.V. Bulakh: conducting laboratory molecular genetic diagnostics, analysis of results obtained, writing and editing the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.В. Зинина / E.V. Zinina: <https://orcid.org/0000-0001-5017-7996>

М.В. Булах / M.V. Bulakh: <https://orcid.org/0000-0002-8674-7230>

О.П. Рыжкова / O.P. Ryzhkova: <https://orcid.org/0000-0003-1285-9093>

О.А. Шагина / O.A. Shchagina: <https://orcid.org/0000-0003-4905-1303>

А.В. Поляков / A.V. Polyakov: <https://orcid.org/0000-0002-0105-1833>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Государственное бюджетное финансирование.

Funding. State budget financing.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Исследование проведено в соответствии с рекомендациями Хельсинкской декларации, протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБНУ «Медико-генетический научный центр» (протокол № 2021-3 от 12.03.2021). Законные представители пациентов дали письменное информированное согласие на проведение молекулярно-генетического тестирования образцов крови и разрешение на анонимную публикацию результатов исследования.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, the study protocol was approved by the biomedical ethics committee of the Research Centre for Medical Genetics (protocol No. 2021-3 dated 12.03.2021). Legal representatives of patients signed written informed consent to molecular-genetic testing and publication of patients' anonymized data.