

## ИССЛЕДОВАНИЕ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ C9ORF72 И ATXN2 ПРИ БОКОВОМ АМИОТРОФИЧЕСКОМ СКЛЕРОЗЕ. КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СОПОСТАВЛЕНИЯ

Демешонок В.С.<sup>1</sup>, Алексеева Т.М.<sup>2</sup>, Назаров В.Д.<sup>3</sup>, Лобзин С.В.<sup>4</sup>, Голдобин В.В.<sup>4</sup>,  
Топузова М.П.<sup>2</sup>, Согоян М.В.<sup>3</sup>, Шевко В.Г.<sup>3</sup>, Лапин С.В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Служба «Помощь людям с БАС и другими нейромышечными заболеваниями», Медицинская клиника Санкт-Петербургской ассоциации общественных объединений родителей детей-инвалидов «ГАООРДИ», Санкт-Петербург, e-mail: demeshonokvs@gmail.com;

<sup>2</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова Минздрава России», Санкт-Петербург;

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург;

<sup>4</sup>ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова Минздрава России», Санкт-Петербург

**Боковой амиотрофический склероз (БАС)** – прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, характеризующееся поражением центральных и периферических двигательных нейронов. Доказан вклад генетических факторов в патогенез заболевания. Наиболее часто определяемая мутация при семейной и спорадической формах БАС в европейской популяции – экспансия в гене C9orf72. Известно, что предэкспансия в гене ATXN2 также увеличивает риск развития БАС. Мы исследовали 82 пациента с различными формами БАС и 40 человек без симптомов поражения двигательных нейронов на носительство этих мутаций. Все пациенты были включены в исследование согласно критериям диагностики БАС (El-Escorial, 2000 г.). Целью исследования явилось определение частоты встречаемости мутаций в генах C9orf72 и ATXN2 у пациентов со спорадической формой БАС и проведение клинико-генетического сопоставления в обследованной группе пациентов. Частота встречаемости мутаций в гене ATXN2 составила 8,5% (7 человек), C9orf72 – 2,4% (2 человека). В статье описаны клинические характеристики пациентов с БАС при наличии данных генетических мутаций. Группа пациентов с выявленной предэкспансией в гене ATXN2 характеризовалась клинической гетерогенностью в виде различных клинических форм и темпов прогрессирования заболевания от медленного до стремительного.

Ключевые слова: боковой амиотрофический склероз, БАС, ATXN2, C9orf72, мутация.

## C9ORF72 AND ATXN2 MUTATIONS IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS. CLINICAL AND GENETIC COMPARISONS

Demeshonok V.S.<sup>1</sup>, Alekseeva T.M.<sup>2</sup>, Nazarov V.D.<sup>3</sup>, Lobzin S.V.<sup>4</sup>, Goldobin V.V.<sup>4</sup>,  
Topuzova M.P.<sup>2</sup>, Sogoyan M.V.<sup>3</sup>, Shevko V.G.<sup>3</sup>, Lapin S.V.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>«ALS-care service» medical clinic GAOORDI, St-Petersburg, e-mail: demeshonokvs@gmail.com;

<sup>2</sup>V.A. Almazov National Medical Research Center, St-Petersburg;

<sup>3</sup>I.P. Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University, St-Petersburg;

<sup>4</sup>I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, St-Petersburg

**Amyotrophic lateral sclerosis is a fatal progressive neurodegenerative disorder, which is characterized by the affect the motor system, involving the upper and lower motor neurons. The pathogenesis of ALS remains unknown. The contribution of genetic factors to the pathogenesis of the disease is proved. Mutation C9orf72 is the most common genetic cause of the familial and sporadic ALS. The polyQ intermediate expansions in ATXN2 is also increased risk for ALS. We investigated C9orf72 and ATXN2 mutations in 82 patients with ALS and 40 unrelated controls without history of neurodegenerative disorders. All patients were examined and included according to El Escorial (2000). We defined expansions for C9orf72 genes in 2 patients (2,4%) and intermediate PolyQ repeat length expansions for ATXN2 in 7 patients (8,5%). Mutations were not determined in none of the control group. The article describes the clinical characteristics of patients with ALS in the presence of these genetic mutations.**

Keywords: Amyotrophic lateral sclerosis, ALS, ATXN2, C9orf72, mutation.

Боковой амиотрофический склероз (БАС) – нейродегенеративное заболевание, характеризующееся прогрессирующей гибелью центральных и периферических двигательных нейронов коры больших полушарий, мозгового ствола и спинного мозга.

Этиология и патогенез заболевания окончательно не установлены, однако роль генетических мутаций в патологическом процессе в настоящее время не вызывает сомнений [1]. Известно, что в большинстве случаев БАС имеет спорадический характер, семейные случаи составляют около 5-10% [2]. Генетические исследования пациентов с БАС в настоящее время позволяют выявить мутантные гены в 68% семейных и 11% спорадических случаев БАС [3].

В европейской популяции наиболее часто выявляется экспансия гексануклеотидных GGGGCC-повторов в гене C9orf72 (число копий повторов более 30), что составляет до 40% семейных и 7% спорадических случаев БАС [4].

Экспансия гена атаксин-2 (ATXN2) более 33 копий CAG-повторов является молекулярно-генетической причиной спиноцеребеллярной атаксии II типа, а носительство аллелей этого гена с промежуточным числом копий CAG-повторов в диапазоне от 26 до 33 ассоциировано с развитием БАС [5; 6]. Согласно литературным данным данный тип мутации является неблагоприятным прогностическим маркером и характеризуется быстрым прогрессированием БАС [7; 8].

**Цель исследования:** оценить частоту встречаемости мутаций в генах C9orf72 и ATXN2 у пациентов со спорадической формой БАС, провести клинико-генетические сопоставления.

#### **Материал и методы исследования**

В исследовании участвовали 82 пациента со спорадической формой БАС, обратившихся в СЗГМУ им. Мечникова, НМИЦ им. В.А. Алмазова с целью диагностического поиска. Все пациенты удовлетворяли критериям El-Escorial, 2000 г. Также была отобрана контрольная группа (40 человек) без симптомов поражения двигательных нейронов. Исследуемые обеих групп проживали в Санкт-Петербурге и Ленинградской области и характеризовались этнической гетерогенностью.

У всех пациентов было получено информированное согласие.

Клинико-неврологический осмотр включал расчет индекса массы тела (ИМТ), так как прогрессирующая потеря массы тела характерна при БАС в связи с прогрессирующими атрофиями мышц, дисфагией и связана с неблагоприятным прогнозом.

При исследовании пациентов применялась функциональная шкала для оценки больных БАС ALSFRS-R, где 48 баллов – норма, а 0 – тяжелейшая инвалидизация больного. Выраженность дизартрии оценивали по шкале Hillel от 10 до 1 баллов, где 10 баллов –

нормальная речь, 1 балл – отсутствие речи. Функцию внешнего дыхания исследовали с помощью спирометра MIR Spiridoc, оценивая жизненную емкость легких (ЖЭЛ). Данные исследования также повторили в динамике через 6 месяцев.

У всех пациентов и участников контрольной группы был проведен анализ количества GGGGCC-повторов в гене C9orf72, а также количества CAG-повторов в гене ATXN2. Экстракция ДНК проводилась с использованием набора QIAamp® DNA Mini Kit в соответствии с инструкцией производителя. Выявление экспансий в генах C9orf72 и ATXN2 проводили с использованием метода ПЦР с праймингом нуклеотидных повторов и с последующим разделением продукта реакции с помощью фрагментного анализа. Последовательность используемых праймеров, условия ПЦР и подсчет количества CAG- и GGGGCC-повторов проводили в соответствии с ранее опубликованными протоколами [9; 10].

Молекулярно-генетические исследования проводились на базе Научно-методического центра молекулярной медицины Минздрава РФ лаборатории диагностики аутоиммунных заболеваний ПСПбГМУ им. И.П. Павлова.

Анализ данных проводился с использованием статистической программы IBM SPSS Statistics 20. Количественные данные представлены медианой (Me) и интерквартильным размахом (Q<sub>1</sub> – Q<sub>3</sub>). Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

### **Результаты исследования и их обсуждение**

Пациенты были распределены в соответствии с классификацией Хондкариана О.А. [11] по формам БАС. Отдельно выделялся вариант прогрессирующей мышечной атрофии (ПМА), входящий в группу болезней двигательного нейрона. Клиническая картина ПМА характеризовалась изолированным поражением периферического двигательного нейрона.

В исследовании участвовали по 24 пациента с бульбарной (БФ), шейно-грудной (ШГФ), пояснично-крестцовой (ПКФ) формами, 4 пациента – с первично-генерализованной (ПГФ), 1 пациент с высокой формой (ВФ) и 6 – с ПМА.

Лишь у двоих больных из 82 (2,4%) была обнаружена экспансия GGGGCC-повторов в гене C9orf72.

Особенностями первого случая было начало заболевания в 56-летнем возрасте с асимметричным поражением в дебюте заболевания (смешанный монопарез левой руки), стремительный темп прогрессирования, появление бульбарного синдрома спустя 7 месяцев от начала болезни, формирование смешанного тетрапареза с преобладанием симптомов поражения центрального двигательного нейрона (грубое повышение мышечного тонуса в руках и ногах), наличие распространенных мышечных фасцикуляций и выраженного

болевого синдрома по типу артралгий (до 7 баллов по визуально-аналоговой шкале оценки боли) на стороне пареза.

Второй случай наблюдали у пациентки 60 лет, бульбарный синдром имел место уже в дебюте заболевания (нарушения речи по типу афонии и дизартрии) и быстро прогрессировал в виде появления через 5 месяцев дисфагии. При госпитализации в стационар выявляли признаки поражения центрального и периферического двигательного нейрона на трех уровнях в виде проявления псевдобульбарного, бульбарного синдромов, смешанного рефлекторного тетрапареза. Темп прогрессирования заболевания за период наблюдения оценивался как стремительный. В течение одного года от начала заболевания развилась полная анартрия, умеренная дисфагия, однако парезы скелетной мускулатуры нарастали медленно, пациентка продолжала себя обслуживать и питаться самостоятельно. В связи с выраженной дисфагией через 2 года от начала заболевания пациентке была выполнена плановая гастростомия.

Предэкспансия в гене ATXN2 была обнаружена у 8,5% (7) пациентов, из них 5 женщин и 2 мужчин. У 1 пациента была ПКФ, у 4 – ШГФ и у 2 – БФ. Ни у одного из пациентов с подтвержденными мутациями не был отягощен семейный анамнез.

В таблице 1 представлено распределение пациентов по формам БАС, участвовавших в исследовании.

Таблица 1

Характеристика форм БАС у пациентов, исследованных на носительство предэкспансии в гене ATXN2

Форма БАС		БФ	ПКФ	ШГФ	ПМА	ПГФ	ВФ	Всего
Количество пациентов, исследованных на носительство предэкспансии ATXN2	Абс.	24	24	24	6	4	1	82
Количество пациентов с наличием предэкспансии в гене ATXN2	Абс.	2	1	4	0	0	0	7
	Доля %	8,3	4,2	16,7				

Для клинико-генетического сопоставления пациенты были разделены на две группы:

1 группа – пациенты с отсутствием предэкспансии в гене ATXN2 (75 человек), 2 группа – пациенты с выявленной мутацией в гене ATXN2 (7 человек). Обоснованность сравнения параметров выборок пациентов с предэкспансией и без предэкспансии подчеркивается высокой статистической мощностью исследования ( $\beta = 1$ ).

Медиана возраста больных на момент начала заболевания во 2 группе была выше, чем в 1, и составила 58,0 лет ( $Q_1=53$ ,  $Q_3=63,5$ ), против 55,0 лет ( $Q_1=49$ ,  $Q_3=62$ ), однако статистически значимых отличий не было определено ( $p=0,065$ ).

В данных группах не было статистически значимых отличий по анамнестическим данным, подробнее в таблице 2. Медиана ИМТ до начала заболевания у пациентов 1 группы составляла 25,59 кг/м<sup>2</sup> ( $Q_1=23,65$ ,  $Q_3=28,40$ ), 2 группы - 27,47 кг/м<sup>2</sup> ( $Q_1=25,45$ ,  $Q_3=30,47$ ), ( $p=0,123$ ). Длительность заболевания в 1 группе достигала 34,0 месяца ( $Q_1=25,0$ ,  $Q_3=43,0$ ), во 2 группе – 36,0 месяцев ( $Q_1=26,5$ ,  $Q_3=40,0$ ), ( $p=0,967$ ).

На момент включения в исследование в данных группах не было статистически значимых отличий по шкале ALSFRS-R, шкале дизартрии Hillel и показателям ЖЭЛ.

Медиана оценки по шкале ALSFRS-R, отражающей функциональное состояние пациентов, в 1 группе составила 36,0 баллов ( $Q_1=29,50$ ,  $Q_3=40,0$ ), во 2 группе - 42,5 балла ( $Q_1=35,50$ ,  $Q_3=45,50$ ) ( $p=0,178$ ).

Выраженность дизартрии в 1 группе оценивалась на 8,0 баллов ( $Q_1=6,0$ ,  $Q_3=10,0$ ), во 2 - 8,5 балла ( $Q_1=7,0$ ,  $Q_3=10,0$ ) ( $p=0,892$ ).

Исследование ЖЭЛ на первом осмотре невозможно было провести 4 пациентам (троем из 2 группы и одной из 1 группы) в связи с наличием выраженной дыхательной недостаточности. Две пациентки находились на искусственной вентиляции легких (ИВЛ), двое использовали неинвазивную вентиляцию легких (НИВЛ) через лицевую маску более 10 часов в сутки. Уровень ЖЭЛ в 1 группе составил 87,0% ( $Q_1=69,50$ ,  $Q_3=99,0$ ), во 2 группе - 91% ( $Q_1=80,0$ ,  $Q_3=103,50$ ) ( $p=0,573$ ).

ИМТ в группе пациентов с выявленной мутацией был статистически значимо выше, чем в группе без мутации, как при первом осмотре ( $p=0,048$ ), так и в динамике через 6 месяцев ( $p=0,050$ ).

К моменту повторного осмотра по причине летального исхода из исследования выбыло 5 пациентов из первой группы и 1 пациент из второй.

При повторном осмотре у пациентов 2 группы определялись более высокие показатели по шкале ALSFRS-R - 38,00 баллов ( $Q_1=31,00$ ,  $Q_3=40,50$ ), чем в первой группе – 27,0 баллов ( $Q_1=23,00$ ,  $Q_3=32,50$ ). Данные различия были статистически значимыми ( $p=0,038$ ). Полученные результаты динамического наблюдения косвенно свидетельствуют о медленном нарастании функционального дефицита в данный отрезок времени у пациентов с предэкспансией по сравнению с группой пациентов без данного типа мутации. Однако небольшая выборка не позволяет сделать такое суждение.

Таблица 2

Клинические характеристики пациентов, исследованных на носительство

предэкспансии в гене ATXN2

Признаки	1 группа - мутация не выявлена, 2 группа – наличие предэкспансии в гене ATXN2	Me	Q1	Q3	p
Возраст начала заболевания, годы	1	55,00	49,00	62,00	0,065
	2	58,00	53,00	63,50	
ИМТ до начала заболевания	1	25,59	23,65	28,40	0,123
	2	27,47	25,45	30,47	
Длительность заболевания, месяцы	1	34,00	25,00	43,00	0,967
	2	36,00	26,50	40,00	
Клинические данные на момент включения в исследование					
ALSFRS-R, баллы	1	36,00	29,50	40,00	0,178
	2	42,50	35,50	45,50	
Шкала дизартрии Hillel, баллы	1	8,00	6,00	10,00	0,892
	2	8,50	7,00	10,00	
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	1	23,38	20,83	25,87	0,048
	2	27,38	24,71	30,49	
ЖЭЛ, %	1	87,00	69,50	99,00	0,573
	2	91,00	80,00	103,50	
Клинические данные в динамике через 6 месяцев					
ALSFRS-R, баллы	1	27,00	23,00	32,50	0,038
	2	38,00	31,00	40,50	
Шкала дизартрии Hillel, баллы	1	6,00	2,50	9,00	0,130
	2	8,00	5,50	10,00	
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	1	22,23	19,53	24,42	0,050
	2	26,66	23,18	29,59	
ЖЭЛ, %	1	62,00	48,00	82,00	0,165
	2	76,00	69,50	89,50	

У троих пациентов (2 – ШГФ и 1 – БФ) с данным типом мутации темп прогрессирования заболевания оценивался как медленный, у остальных 4 пациентов – стремительный. Одна пациентка с БФ умерла через 23 месяца от начала болезни, пациент с ШГФ – через 30 месяцев. Пациентка с ПКФ была переведена на ИВЛ через 3 года от начала заболевания и к моменту окончания исследования находилась на ИВЛ в течение еще 3 лет.

У 75 пациентов (91,5%) количество GGGGCC-повторов составило 22-23, что соответствует допустимым значениям варианта нормы.

В контрольных образцах (40 здоровых добровольцев) предэкспансии GGGGCC-повторов в данном гене не было обнаружено.

Итак, частота встречаемости мутации гена ATXN2 в обследованной группе составила 8,5% случаев. Группа пациентов с выявленной предэкспансией в гене ATXN2

характеризовалась клинической гетерогенностью в виде различных форм БАС и различных темпов прогрессирования от медленного до стремительного. Выявлена тенденция к более старшему возрасту дебюта заболевания у пациентов с наличием данного типа мутации ( $p=0,065$ ).

Экспансия гексануклеотидных GGGGCC-повторов в гене C9orf72 в нашем исследовании встречалась лишь у 2,4% пациентов, что значительно ниже этого показателя в сравнении с другими европейскими популяциями. Однако наши результаты не противоречат данным другого российского исследования, где этот тип мутации выявлялся в 3% случаев [12].

### **Заключение**

Таким образом, в исследованной выборке пациентов предэкспансия гене ATXN2 более распространена, чем экспансия в гене C9orf72. Одно из российских исследований также показало, что мутация в гене ATXN2 у больных спорадическим БАС выявлялась чаще, чем в гене C9orf72: в 5% случаев против 1,8% [13].

Тем не менее молекулярно-генетическое исследование, а именно поиск мутаций в генах C9orf72 и ATXN2, является важным дополнением к клинической диагностике БАС, так как может позволить верифицировать диагноз на ранних стадиях БАС. Для определения значимых клинико-генетических корреляций необходимо дальнейшее накопление материала и исследование на большем количестве пациентов.

### **Список литературы**

1. Al-Chalabi A., Calvo A., Chio A. Analysis of amyotrophic lateral sclerosis as a multistep process: a population-based modelling study. *The lancet* 2014. vol. 13. no. 11. P. 1108–1113.
2. Chia R., Chiò A., Traynor B.J. Novel genes associated with amyotrophic lateral sclerosis: diagnostic and clinical implications. *Lancet Neurol.* 2018. vol. 17. no. 1. P. 94-102.
3. Renton A., Chiò A., Traynor B. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat. Neurosci.* 2014. vol. 17. no. 1. P. 17–23.
4. Liu Y., Yu J.-T., Zong Y. et al. C9orf72 mutations in neurodegenerative diseases. *Mol. Neurobiol.* 2014. vol. 49. no. 1. P. 386–398.
5. Lee T., Li Y.R., Ingre C., Weber M., Grehl T. Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions in European ALS patients. *Hum. Mol. Genet.* 2011. vol. 20. P. 1697–1700.
6. Sproviero W., Shatunov A., Stahl. D. ATXN2 trinucleotide repeat length correlates with risk of ALS. *Neurobiol. Aging.* 2017. vol. 51. P. 178.e1–178.e9.

7. Borghero G., Pugliatti M., Marrosu F., Marrosu M.G., Murru M.R., Floris G. ATXN2 is a modifier of phenotype in ALS patients of Sardinian ancestry. *Neurobiol. Aging*. 2015. V. 36 (10). P. e1–5.
8. Chio A., Calvo A., Moglia C., Canosa A., Brunetti M., Barberis M. ATXN2 polyQ intermediate repeats are a modifier of ALS survival. *Neurology*. 2015. vol. 84. no. 3. P. 251–258.
9. Warner J.P., Barron L.H., Goudie D., Kelly K., Dow D., Fitzpatrick D.R., Brock D.J. A general method for the detection of large CAG repeat expansions by fluorescent PCR. *J Med Genet* 1996. vol. 33. no. 12. P. 1022–1026.
10. DeJesus-Hernandez M., Mackenzie I.R., Boeve B.F., Boxer A.L., Baker M., Rutherford N.J., Nicholson A.M., Finch N.A., Flynn H., Adamson J., Kouri N., Wojtas A., Sengdy P., Hsiung G.Y., Karydas A., Seeley W.W., Josephs K.A., Coppola G., Geschwind D.H., Wszolek Z.K., Feldman H., Knopman D.S., Petersen R.C., Miller B.L., Dickson D.W., Boylan K.B., Graff-Radford N.R., Rademakers R. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*. 2011. vol. 72. no. 2. P. 245–256.
11. Хондариан О.А., Бунина Т.Л., Завалишин И.А. Боковой амиотрофический склероз. М.: Медицина, 1978. 264 с.
12. Абрамычева Н.Ю., Лысогорская Е.В., Шпилюкова Ю.С., Ветчинова А.С., Захарова М.Н., Иллариошкин С.Н. Молекулярная структура бокового амиотрофического склероза в российской популяции // *Нервно-мышечные болезни*. 2016. Т6. №4. С.21-27.
13. Федотова Е.Ю., Абрамычева Н.Ю., Мороз А.А., Ключников С.А., Лысогорская Е.В., Захарова М.Н., Тимербаева С.Л., Иллариошкин С.Н. Гены ATXN2 и C9orf72 как универсальные факторы развития различных нейродегенеративных заболеваний // *Неврологический журнал*. 2016. Т21. № 6. С.323–329.