

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2023.06.3-11>

Новые варианты нуклеотидных последовательностей гена *DYSF*, выявленные методом секвенирования нового поколения

Исаев А.А.^{1,2}, Бардаков С.Н.³, Мкртчян Л.А.⁴, Мусатова Е.В.², Хмелькова Д.Н.², Гусева М.В.², Каймонов В.С.², Яковлев И.А.^{1,2,4}, Деев Р.В.^{1,4,5}

1 – ПАО «Институт стволовых клеток человека»

119333, г. Москва, ул. Губкина, д.3, стр.2, а/я 373

2 – ПАО «Центр генетики и репродуктивной медицины «Генетико»

119333, г. Москва, ул. Губкина, д. 3, корп.1

3 – ФГБОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

194044, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6

4 – ООО «Генотаргет»

121614, г.Москва, вн.тер. г. Муниципальный Округ Крылатское, ул. Крылатские Холмы, д. 32, к. 2

5 – ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

191015, г. Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д. 41

Введение. Среди поясно-конечностных мышечных дистрофий (ПКМД) по частоте встречаемости дисферлинопатия занимает второе место в мире после кальпаинопатии. Заболевание характеризуется относительно поздней манифестацией, а сходная клиническая картина в группе ПКМД в ряде случаев создает значимые сложности в дифференциальной диагностике. Методом секвенирования нового поколения (NGS) можно быстро и эффективно определить вариант нуклеотидной последовательности гена *DYSF*, приводящий к нарушению синтеза белка дисферлина.

Цель исследования: определить эффективность выявления вариантов нуклеотидных последовательностей в гене *DYSF* методом NGS у пациентов с клиническим диагнозом диферлинопатия и оценить возможности данного метода в дифференциальной диагностике ПКМД.

Методы. Поиск генетических вариантов в гене *DYSF* производился у 157 пациентов при наличии клинических проявлений ПКМД, сопровождающихся повышением уровня креатинфосфокиназы (КФК) в 10-100 раз, манифестацией в возрасте 2-73 лет. У 27 пациентов выявлены изменения в последовательности гена *DYSF*. Методом Сэнгера было обследовано 9 из 27 человек – 34 (15-58)%. 18 пациентов было обследовано методом NGS, что составляет 67(42-85)%. У 2 родственных пациентов, у которых был выявлен только один вариант измененной последовательности гена *DYSF*, для поиска крупных делеций и (или) дупликаций была проведена мультиплексная лигаза-зависимая амплификация (MLPA). Выявленные методом NGS генетические варианты верифицировались референтным методом – ПЦР. Гистологическое и иммуногистологическое исследование выполнено четырем пациентам с неоднозначным результатом молекулярно-генетической диагностики. В качестве биоптата забран фрагмент (5 мм³) латеральной головки четырехглавой мышцы бедра.

Результаты и выводы. Методом NGS в гене *DYSF* был выявлен 21 различных генетический вариант у 27 пациентов. 16 из 21 генетических вариантов ранее описаны; в четверти случаев (5 вариантов, 25(0-52)%) генетические варианты являются ранее не описанными (novel). Из 21 выявленного варианта на основании критериев ACMG 12 (57(31-81)%) были классифицированы как патогенные, 5 (25(0-51)%) – как вероятно патогенные, 4 (20(0-46)%) – как варианты с неизвестной клинической значимостью.

Ключевые слова: секвенирование, NGS, дисферлин, дисферлинопатия, ПКМД R2 (2B).

Для цитирования: Исаев А.А., Бардаков С.Н., Мкртчян Л.А., Мусатова Е.В., Хмелькова Д.Н., Гусева М.В., Каймонов В.С., Яковлев И.А., Деев Р.В. Новые варианты нуклеотидных последовательностей гена *DYSF*, выявленные методом секвенирования нового поколения. *Медицинская генетика* 2023; 22(6): 3-11.

Автор для корреспонденции: Мкртчян Лилиит Арменовна; e-mail: lililit@genotarget.com

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Поступила: 01.06.2023

New nucleotide sequence variants of the *DYSF* gene, identified by the next-generation sequencing

Isaev A.A.^{1,2}, Bardakov S.N.³, Mkrtchyan L.A.⁴, Musatova E.V.², Khmelkova D.N.², Guseva M.V.², Kaimonov V.S.², Yakovlev I.A.^{1,2,4}, Deev R.V.^{1,4,5}

- 1 – Public joint stock company "Human Stem Cells Institute"
3, bldg. 2, Gubkina st., PO box 373, Moscow, 119333, Russian Federation
- 2 – Public joint stock company "Genetico" Center for Genetics and Reproductive Medicine
3, bldg.1, Gubkina st., Moscow, 119333, Russian Federation
- 3 – "Military Medical Academy named after S.M. Kirov"
6, Academician Lebedeva st., St. Petersburg, 194044, Russian Federation
- 4 – Limited liability Company "Genotarget"
32, bldg.2, Krylatskie Holmy st., Moscow, 121614, Russian Federation
- 5 – North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov
14, Kirochnaya st., St. Petersburg, 191015, Russian Federation

Background. According to the frequency of occurrences dysferlinopathy occupies the second place in world among limb-girdle muscular dystrophy (LGMD) after calpainopathy. The disease has a relatively late manifestation and the similar clinical picture with other LGMD. In some cases, that creates significant difficulties in differential diagnostics. New generation sequencing (NGS) is method that quickly and efficiently allows to determine the variant of the *DYSF* gene that leads to violation of protein synthesis.

Aim: to determine the effectiveness of identifying variants of nucleotide sequences in the *DYSF* gene by the NGS in patients with a clinical diagnosis of dysferlinopathy and also to evaluate the possibilities of this method in differential diagnostics of LGMD.

Methods. The search for genetic variants of the *DYSF* gene was performed in patients with detected phenotype of LGMD, as well as 10 to 100 times higher levels of creatine kinase (CK) and manifestation at the age of 2-73 years. In total, 157 patients with a clinical signs of LGMD were included in the study. Changes in the sequence of the *DYSF* gene were detected in 27 of them. 9 of 27 people – 34(15-58)% were examined with Sanger sequencing. 18 of them – 67(42-85)% were examined by the NGS method. In two patients only one changed variant in the *DYSF* gene was detected, in this regard multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) was performed to search for large deletions and (or) duplications. The identified genetic variants were verified by the reference method – PCR. Histological and immunohistological examination was performed in four patients with ambiguous results. As a biopsy material for examination were used fragments (5 mm³) of the lateral head of the quadriceps femoral muscle.

Results and conclusions. Using the NGS method, in 27 patients 21 genetic variant of the *DYSF* gene was identified. 16 variants out of 21 belong to the category of previously described; thus, in almost a quarter of cases (5) – 25(0-52)% variants weren't described before (novel). Among the 21 identified variants, based on ACMG criteria, 12 – 57(31-81)% variants were classified as pathogenic, 5 – 25(0-51)% as probably pathogenic and 4 – 20(0-46)% as variants with uncertain significance, however, all detected variants were accompanied by a detailed clinical signs of LGMD.

Keywords: sequencing, NGS, dysferlin, dysferlinopathy, LGMD R2 (LGMD 2B).

For citation: Isaev A.A., Bardakov S.N., Mkrtchyan L.A., Musatova E.V., Khmelkova D.N., Guseva M.V., Kaimonov V.S., Yakovlev I.A., Deev R.V. New nucleotide sequence variants of the *DYSF* gene, identified by the next-generation sequencing. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]* 2023; 22(6): 3-11. (In Russ.)

Corresponding author: Lilit A. Mkrtchyan; **e-mail:** lilit@genotarget.com

Funding. The study had no sponsorship.

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

Accepted: 01.06.2023

Введение

Среди поясно-конечностных мышечных дистрофий (ПКМД) по частоте встречаемости дисферлинопатия занимает 2 место в мире после кальпаинопатии [1]. Как известно, дисферлинопатия характеризуется относительно поздней манифестацией, а сходная клиническая картина в группе ПКМД в ряде случаев создает значимые сложности в дифференциальной диагностике [2]. Описано три клинических

фенотипа дисферлинопатии, являющихся заболеваниями с аутосомно-рецессивным типом наследования: миопатия Миоши (ОМIM 254130), ПКМД тип R2 (2B) (ОМIM 253601), дистальная миопатия в передней тиббиальной группе мышц голени (ОМIM 606768). Для миопатии Миоши в начальный период заболевания характерно преимущественное поражение задней группы мышц голени, тогда как при ПКМД тип R2 (2B)

наблюдается преимущественно проксимальная мышечная слабость. Дистальная миопатия с началом в передней тиббиальной группе мышц голени характеризуется преобладанием поражения передней группы мышц. Однако ряд клинических форм заболевания характеризуется стертой или нетипичной клинической картиной, нуждающейся в современной молекулярно-генетической и морфологической дифференциальной диагностике [3, 4].

Установлено, что причиной заболевания является нарушение функции белка дисферлина, ответственного за кальций-зависимую репарацию сарколеммы в волокнах поперечнополосатой скелетной мышечной ткани. Этот белок также принимает участие в процессах регуляции слияния миобластов на этапах миогистогенеза и регенерации [1]. Ген дисферлина *DYSF* располагается в регионе 2p13 [1, 5].

Накопленный опыт показывает, что для возникновения клинических проявлений дефицита дисферлина необходимо наличие патогенных вариантов гена в гомозиготной или компаунд-гетерозиготной формах [6]. Известно, что нуклеотидные замены и инсерции и (или) делеции нескольких нуклеотидов встречаются гораздо чаще, чем крупные делеции и дупликации регионов гена *DYSF* [5]. В лабораторной практике могут возникать технические сложности в определении патогенных вариантов в протяженном гене *DYSF*, который содержит 55 экзонов (150 т.п.н.). В нем описано более 720 каузативных генетических вариантов [7]. Среди них не удается выделить группу мажорных повреждений [7].

Описаны этнические группы, в которых доля ряда генетических вариантов весьма высока: испанцы — с.6086C>T (p.R1905X) у пациентов из 5 неродственных семей [8]; итальянцы — с.2875C>T (p.R959W) (для этого варианта рассматривается эффект основателя) [9]. При обследовании 10 пациентов из 8 семей с ПКМД из Израиля, являющихся по своему происхождению кавказскими евреями, в результате анализа всей кодирующей последовательности и экзонно-интронных областей гена *DYSF* был выявлен частый генетический вариант с.2779delG в гомозиготной форме, приводящий к сдвигу рамки считывания, появлению преждевременного стоп-кодона и полной утрате функциональности белка. Частота носительства этого патогенного варианта в этнической группе составляет 4% [10, 11].

Выраженный клинико-генетический полиморфизм и нередко нетипичная клиническая картина вносят дополнительные сложности в процесс верификации забо-

левания. Часто методы ПЦР-диагностики оказываются неинформативными [12, 13]. Таким образом, особенности генетической природы болезни обуславливают необходимость внедрения в диагностический процесс метода секвенирования нового поколения (NGS) для ускорения поиска каузативных вариантов в большом количестве генов, ответственных за развитие клинически сходных форм заболевания, у пациентов с подозрением на дисферлинопатию [12-15].

Цель исследования: определить эффективность выявления вариантов нуклеотидных последовательностей в гене *DYSF* методом NGS у пациентов с клиническим диагнозом дисферлинопатия и оценить возможности данного метода в дифференциальной диагностике ПКМД.

Методы

Характеристика пациентов. Поиск генетических вариантов в гене *DYSF* производился у пациентов в случаях выявления фенотипа ПКМД с повышением уровня креатинфосфокиназы (КФК) в 10-100 раз и манифестации в возрасте 2-73 лет. Предположение о вероятном диагнозе дисферлинопатии также выдвигалось при наличии у пациентов фенотипа миопатии с преимущественным поражением задней и медиальной групп мышц бедер, сохранением ягодичных мышц и высокими значениями КФК.

Пациенты были включены в клиническое исследование (NCT04824040) на основании добровольного информированного согласия после разъяснения потенциальной пользы и возможных рисков. Показания к генетической диагностике были определены врачом-неврологом и врачом-генетиком после сбора анамнеза, составления генеалогической карты, клинического, лабораторного (определение уровня активности сывороточной КФК, миоглобина), инструментального (МРТ мышц, игольчатая ЭМГ), а в ряде случаев и патоморфологического исследований.

Всего в исследование было включено 157 пациентов. У 27 из них выявлены изменения в последовательности гена *DYSF*. Методом Сэнгера было обследовано 9 из 27 человек — 34(14-58)%¹, включая родственников и пробандов, вероятно имеющих эндемичный вариант измененной нуклеотидной последовательности гена *DYSF*. 18 из 27 пациентов — 67(42-86)% обследованы методом NGS. У 4 больных — 15(4-34)% обследо-

¹Здесь и далее в скобках приведены доверительные интервалы полученных значений.

ние методом NGS было выполнено в связи с неэффективностью ранее произведенных таргетных генетических исследований, реализованных секвенированием по методу Сэнгера. У 2 родственных пациентов, у которых был выявлен только один вариант измененной последовательности гена *DYSF*, для поиска крупных делеций и (или) дупликаций была проведена мультиплексная лигаза-зависимая амплификация (MLPA).

Выделение ДНК из клеток крови осуществлялось с использованием наборов для выделения нуклеиновых кислот «innuPREP Blood DNA kit» (AnalytikJena, Германия) и «QIAamp DNA Blood Mini QIAcube Kit» (QIAGEN, Германия) на приборе QIAcube (QIAGEN, Германия). ДНК (1500 нг на образец) дробили до 150 нк при помощи системы Covaris (Thermo Fisher Scientific, США), после чего готовили библиотеки с использованием «SureSelect Human All Exon V7 kit» (Agilent, США) согласно протоколу производителя. Валидация библиотеки приводилась на приборе TapeStation 4200 (Agilent, США). Секвенирование экзона проводили на системе NovaSeq6000 (Illumina, США) методом парно-концевых чтений, с длиной прочтений в 100 нуклеотидов со средним покрытием не ниже 70×.

При помощи программного модуля SEQPURGE (США) была проведена очистка сырых данных и удалены последовательности адаптеров. Затем прочтения выравнивались на референсный геном человека hg19 с помощью программного модуля BWA-MEM (США). Фильтрацию оптических и ПЦР дубликатов проводили, используя модуль SAMBLASTER (США); локальную оптимизацию выравниваний — модуль ABRA2. Обнаружение вариантов и их фильтрацию согласно качеству проводили с использованием пакета FREEBAYES (США), аннотирование вариантов — модуля ENSEMBL-VEP (Великобритания).

При поиске клинически значимых генетических вариантов не учитывались не отмеченные в базе данных ClinVar [7] как патогенные, а также варианты, от-

меченные как патогенные с максимальной частотой встречаемости в популяциях менее 2%. Классификация вариантов проводилась в соответствии с рекомендациями Американской коллегии медицинской генетики и геномики (ACMG) [16].

Выявленные генетические варианты верифицировались референтным методом — ПЦР (табл. 1).

В первом раунде ПЦР использовали полимеразу BETAQ-1000 Bullseye Taq DNA Polymerase (MidSci, США). Далее ПЦР-продукты разгоняли в 2,5% агарозном геле и визуализировали под ультрафиолетом. Реакцию секвенирования проводили с использованием набора BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher Scientific, США) и амплификационных праймеров. Капиллярный электрофорез проводился на приборе 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

При обнаружении только одного варианта измененной последовательности гена *DYSF* для поиска крупных делеций и (или) дупликаций была проведена MLPA с использованием набора P268-A3 DYSF-v01 (MRC-Holland BV, Нидерланды), который включает в себя 40 из 55 экзонов гена *DYSF*.

Гистологическое и иммуногистологическое исследование. Прижизненное патологоанатомическое исследование (инвазивное исследование) было выполнено четырем пациентам с неоднозначными результатами молекулярно-генетического анализа с целью дифференциальной диагностики и подтверждения морфофункциональной значимости выявленных генетических вариантов. В качестве материала забран фрагмент (5 мм³) латеральной головки четырехглавой мышцы бедра. Материал фиксировался и проводился или по рутинной «парафиновой» методике или с сохранением биоптата в жидком азоте с последующей криотомией. Парафиновые срезы изготавливались по стандартной методике, препараты окрашивали гематоксилином и эозином. Изучали продольные и поперечные

Таблица 1. Праймеры для гена *DYSF*, использованные для проверки и подтверждения выявленных генетических вариантов.

Table 1. Primers for the *DYSF* gene used to test and confirm the identified genetic variants.

Генетический вариант, hg19	Праймеры F	Праймер R	Длина ПЦР продукта, нк
chr2:g.71795437del	GACTAAGTTGGCCCTTGTTG	TCAGTCCTGCGAGAGTTCA	308
chr2:g.71891537G>T	CCCAAGGAAAGAAGACTCC	TTGTCTAGAGAAGCAGGCA	315
chr2:g.71839803dup	GCTGTGGGGATTATCTGC	CTTCTCATTCAGGTCTCCGT	389
chr2:g.71906303C>T	ACAGCCAAGAAGTGCTCCT	ACAGGTCACTATTAAAGCCAATG	419
chr2:g.71780319G>A	ATCGGGAAGTACGGGAAC	CTGGCTGACTCCTTGAAATG	344

срезы. Иммуногистохимическое исследование выполнено с применением антител к дисферлину (Anti-Dysferlin antibody, Abcam, Великобритания).

Статистический анализ. Анализ результатов проведен с использованием инструментов описательной и аналитической статистики в программе Past (версия 4.09, Норвегия), LePAC (версия 2.20.6, Франция). Для сравнения двух независимых выборок использован критерий Манна–Уитни, для анализа корреляций – ранговый коэффициент корреляции Пирсона. При проверке статистических гипотез ориентировались на p -значения и 95% доверительные интервалы (ДИ). Для графического представления данных использовалась программа GraphPadPrism (версия 6.01., США).

Результаты

Средний возраст манифестации дисферлинопатий составлял 17,6(14–20) лет, а средний возраст обследования составил 31(26–36) год.

В ходе проведения клинико-генетического сопоставления в 11 случаях заболевания (41(20–65)%) выявлен дистальный фенотип – миопатии Миоши, а в 12 случаях – 45(22–68)%, определен фенотип ПКМД тип R2 (2В). Кроме того, у трех пациентов, составляющих 11(0–33)% от общего числа пациентов, выявлен проксимо-дистальный фенотип. Наиболее редко встречающийся врожденный вариант фенотипа был обнаружен у одного пациента 24 лет – 4(0–21)% с компаунд-гетерозиготным изменением в гене *DYSF*, представленным однонуклеотидными делециями в экзонах 12 и 45.

Средний возраст манифестации составил 17,8 (16–19) года у пациентов с фенотипами миопатии Миоши и 18 (14–22) лет у пациентов с ПКМД. Таким образом, показатель возраста манифестации у пациентов с разными фенотипами статистически значимо не различался (критерий Манна–Уитни, $p = 0,89$). По уровню повышения КФК фенотипы миопатии Миоши и ПКМД 2В также статистически значимо не различались – 12793 Ед/л (6293 – 209712 Ед/л) и 8154 Ед/л (2589 – 14755 Ед/л), соответственно (критерий Манна–Уитни, $p = 0,45$).

При сравнении группы пациентов, имеющих гомозиготный вариант с.2833del, с остальными пациентами по возрасту манифестации, уровню КФК и оценкам функционального класса по шкалам Виньося, ГМВ и Скотта статистически значимых различий не выявлено (критерий Манна–Уитни, $p > 0,05$).

Иммуногистохимическое исследование биоптатов у четырех пациентов позволило подтвердить миопатический паттерн поражения с отсутствием экспрессии дисферлина в мышцах.

Методами NGS, MLPA и секвенирования по Сэнгеру [13, 14] в гене *DYSF* был выявлен 21 различный генетический вариант у 27 больных (табл. 2), 16 из них относятся к категории ранее описанных патогенных, вероятно патогенных и вариантов с неизвестной клинической значимостью. В четверти случаев (5) – 25(0–52)% генетические варианты являются ранее не описанными (novel).

В одном случае при выявлении гетерозиготного миссенс варианта в гене *DYSF* не удалось обнаружить изменение во втором аллеле методом MLPA, несмотря на отсутствие экспрессии белка дисферлина при иммуногистохимическом исследовании биоптата мышцы.

У 27 пациентов методами NGS и секвенирования по методу Сэнгера, выявлено 18 – 67(42–86)% генетических вариантов, встречаемых однократно или же неоднократно, но среди родственных пациентов. Три варианта – 12(0–33)% (с.2833del, с.4941del, с.4282C>T) обнаружены неоднократно, в нескольких неродственных семьях. Методом MLPA у 2 – 8(0–27)% родственных пациентов выявлена крупная делеция, затрагивающая экзоны 41 и 42 гена *DYSF*.

Генетические варианты в гомозиготном состоянии выявлены у 16 пациентов – 59(35–81)% (у 7 пациентов – методом NGS и 9 – секвенированием по методу Сэнгера); компаунд-гетерозиготный вариант найден у 8 пациентов – 30(12–54)%, еще у трех пациентов – 12(0–33)% выявлен только один гетерозиготный генетический вариант (рис. 1а).

Выявлены генетические варианты следующих типов (рис. 1б):

- фреймшифт (с небольшими инсерциями и делециями, приводящими к сдвигу рамки считывания) – у 18 пациентов – 67(42–86)%;

- однонуклеотидные замены, приводящие к замене аминокислоты (генетические варианты по типу миссенс) представлены у семи обследованных пациентов – 26(0–50)%;

- точечные замены, приводящие к появлению преждевременной терминации трансляции белка (генетические варианты у типа нонсенс) выявлены у пяти пациентов – 19(0–42) %;

- однонуклеотидные замены в регионах сплайсинга обнаружены у четырех обследованных пациентов – 15(0–37)%;

- крупные делеции экзонов 41 и 42 обнаружены у двух пациентов – 8(0–27)%.

Таблица 2. Характеристика выявленных вариантов гена *DYSF* (hg19)Table 2. Characteristics of the identified variants of the *DYSF* gene (hg19)

№ п/п	Эк-зон	Изменение ДНК	Изменение кДНК	Изменение белка	Тип варианта	Зиготность	Класс патогенности	Ссылка на источник
1.	19	chr2:g.71778768T>C	c.1724T>C	p.Leu575Pro	Миссенс	Гомозигота	ВУС	База данных ClinVar [7]
2.	26	chr2:g.71795437del	c.2833del	p.Ala945LeufsTer21	Фреймшифт	Гомозигота	Пат.	Е.Harris et al., 2016 [17]
3.	26	chr2:g.71795437del	c.2833del	p.Ala945LeufsTer21	Фреймшифт	Гомозигота	Пат.	Е.Harris et al., 2016 [17]
4.	26	chr2:g.71795437del	c.2833del	p.Ala945LeufsTer21	Фреймшифт	Гомозигота	Пат.	Е.Harris et al., 2016 [17]
5.	26	chr2:g.71795437del	c.2833del	p.Ala945LeufsTer21	Фреймшифт	Гомозигота	Пат.	Е.Harris et al., 2016 [17]
6.	26	chr2:g.71795437del	c.2833del	p.Ala945LeufsTer21	Фреймшифт	Гомозигота	Пат.	Е.Harris et al., 2016 [17]
7.	26	chr2:g.71795437del	c.2833del	p.Ala945LeufsTer21	Фреймшифт	Гомозигота	Пат.	Е.Harris et al., 2016 [17]
8.	26	chr2:g.71795437del	c.2833del	p.Ala945LeufsTer21	Фреймшифт	Гомозигота	Пат.	Е.Harris et al., 2016 [17]
9.	26	chr2:g.71795437del	c.2833del	p.Ala945LeufsTer21	Фреймшифт	Гомозигота	Пат.	Е.Harris et al., 2016 [17]
10.	26	chr2:g.71795437del	c.2833del	p.Ala945LeufsTer21	Фреймшифт	Гомозигота	Пат.	Е.Harris et al., 2016 [17]
11.	26	chr2:g.71795437del	c.2833del	p.Ala945LeufsTer21	Фреймшифт	Гомозигота	Пат.	Е.Harris et al., 2016 [17]
12.	26	chr2:g.71795437del	c.2833del	p.Ala945LeufsTer21	Фреймшифт	Гомозигота	Пат.	Е.Harris et al., 2016 [17]
13.	26	chr2:g.71795437del	c.2833del	p.Ala945LeufsTer21	Фреймшифт	Гомозигота	Пат.	Е.Harris et al., 2016 [17]
14.	29	chr2:g.71797809C>T	c.3166C>T	p.Arg1056Ter	Нонсенс	Гомозигота	Пат.	К. Nguyen, et al., 2005 [18]
15.	11	chr2:g.71748001C>A	c.1116C>A	p.Ser372Arg	Миссенс	Гетерозигота	Пат.	К. Nguyen, et al., 2007 [19]
	44	chr2:g.71887719del	c.4941del	p.Lys1648ArgfsTer4	Фреймшифт		Пат.	Е.Harris et al., 2016 [17]
16.	12	chr2:g.71748023del	c.1138del	p.Asp380ThrfsTer27	Фреймшифт	Гетерозигота	Вер. Пат.	База данных ClinVar [7]
	44	chr2:g.71887719del	c.4941del	p.Lys1648ArgfsTer4	Фреймшифт		Пат.	Е.Harris et al., 2016 [17]
17.	18	chr2:g.71778294G>A	c.1692+8G>A	-	Нарушение сплайсинга	Гетерозигота	Вер. Пат.	База данных ClinVar [7]
	53	chr2:g.71908183G>A	c.6116G>A	p.Arg2039Gln	Миссенс		Вер. Пат.	М. Aoki, et al., 2001 [20]
18.	26	chr2:g.71795437del	c.2833del	p.Ala945LeufsTer21	Фреймшифт	Гетерозигота	Пат.	Е.Harris et al., 2016 [17]
	41-42		del ex41,42 (MLPA)		Крупная делеция		Пат.	Вариант не описан
19.	41-42		del ex41,42 (MLPA)		Крупная делеция	Гетерозигота	Пат.	Вариант не описан
20.	39	chr2:g.71839803dup	c.4254dup	p.Ile1419HisfsTer8	Фреймшифт	Гетерозигота	Пат.	Р.Cagliani et al., 2005 [21]
	-	chr2:g.71753478T>C	c.1276+2T>C	-	Нарушение сплайсинга		Пат.	Вариант не описан

Продолжение табл. 2 см. на стр. 9.

№ п/п	Эк-зон	Изменение ДНК	Изменение кДНК	Изменение белка	Тип варианта	Зиготность	Класс патогенности	Ссылка на источник
21.	39	chr2:g.71839831C>T	c.4282C>T	p.Gln1428Ter	Нонсенс	Гетерозигота	Пат.	База данных ClinVar [7]
22.	39	chr2:g.71839831C>T	c.4282C>T	p.Gln1428Ter	Нонсенс	Гетерозигота	Пат.	База данных ClinVar [7]
	43	chr2:g.71886125C>T	c.4873C>T	p.Arg1625Ter	Нонсенс		Пат	M. Aoki, et al., 2001 [20]
23.	8	chr2:g.71742844C>T	c.755C>T	p.Thr252Met	Миссенс	Гетерозигота	ВУС	M. Sacciotolo, 2011 [22]
	-	chr2:g.71780288A>G	c.1900A>G	p.Thr634Ala	Миссенс		Пат.	Вариант не описан
	44	chr2:g.71887717del	c.4822delG	p.Gly1608Glyfs	Фреймшифт		Вер. Пат.	K. Nguyen, et al., 2007 [19]
24.	45	chr2:g.71891537G>T	c.5143G>T	p.Ala1715Ser	Миссенс	Гетерозигота	ВУС	База данных ClinVar [7]
25.	46	g.71892311C>T	c.5194C>T	p.Arg1732Trp	Миссенс	Гомозигота	Пат.	M. Aoki, et al., 2001 [20]
26.	52	chr2:g.71906303C>T	c.6001C>T	p.Gln2001Ter	Нонсенс	Гетерозигота	Пат	S.Q. Jin, et al., 2016 [23]
	-	chr2:g.71780319G>A	c.1984+1G>A	-	Нарушение сплайсинга		Вер. Пат.	Вариант не описан
27.	-	chr2:g.71748039G>C	c.1149+5G>C	-	Нарушение сплайсинга	Гомозигота	ВУС	Вариант не описан

Примечания: Пат. — патогенный вариант; Вер. Пат. — вероятно патогенный вариант; ВУС - вариант неопределенного (или неизвестного) значения.

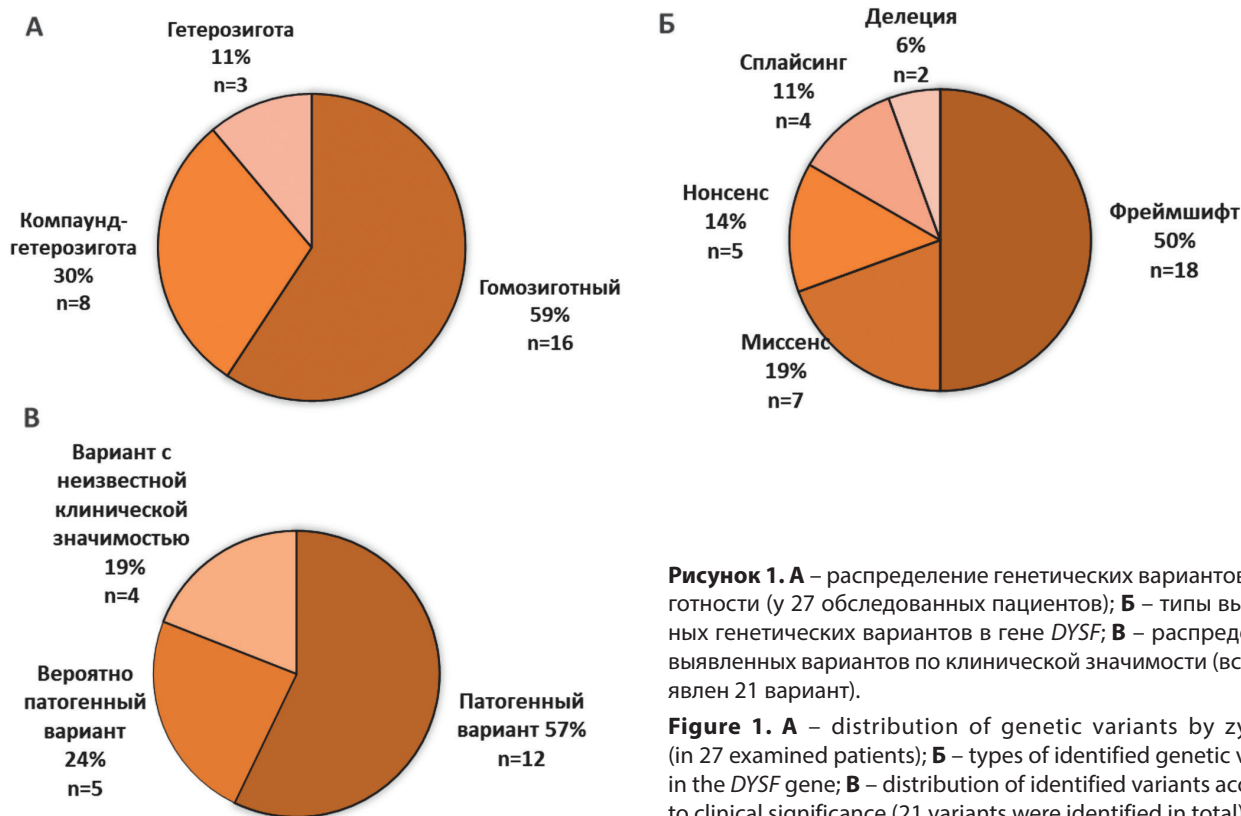


Рисунок 1. А – распределение генетических вариантов по зиготности (у 27 обследованных пациентов); **Б** – типы выявленных генетических вариантов в гене *DYSF*; **В** – распределение выявленных вариантов по клинической значимости (всего выявлен 21 вариант).

Figure 1. А – distribution of genetic variants by zygosity (in 27 examined patients); **Б** – types of identified genetic variants in the *DYSF* gene; **В** – distribution of identified variants according to clinical significance (21 variants were identified in total).

Среди 21 выявленного варианта генетической последовательности нуклеотидов на основании критериев ACMG [16] 12 – 57(31-81)% вариантов были классифицированы как патогенные, 5 – 25(0-51)% – как вероятно патогенные, 4 – 20(0-46)% – как варианты с неизвестной клинической значимостью (рис. 1в).

Обсуждение

Изменение последовательности нуклеотидов в гене *DYSF* в гомозиготной или компаунд-гетерозиготной формах может приводить к тяжелым клиническим проявлениям дефицита дисферлина. Генетические варианты с нуклеотидными заменами или делециями/инсерциями встречаются гораздо чаще (у 92,5% пациентов), чем крупные делеции и дубликации регионов гена *DYSF*, что соответствует результатам других исследовательских групп [5].

При сравнении группы пациентов, имеющих гомозиготный вариант, с остальными пациентами по возрасту манифестации, уровню КФК и оценкам функционального класса статистически значимых различий выявлено не было. Однако по данным некоторых исследователей пациенты с компаунд-гетерозиготными вариантами часто имеют более выраженный дефицит дисферлина, но клинические проявления средней степени тяжести [3].

Средний возраст манифестации составил 17,8 (16-19) лет у пациентов с фенотипами миопатии Миоши и 18 (14-22) лет у пациентов с клинической картиной ПКМД, что соответствует данным, полученным другими авторами [3, 9]. Однако средний возраст обследования составил 31 (26-36) год, что говорит о неэффективности ранее проводимого в данной группе пациентов диагностического процесса.

У 3 пациентов выявлен только 1 измененный генетический вариант последовательности нуклеотидов в гене *DYSF* в гетерозиготном состоянии, им было произведено иммуногистохимическое исследование биоптатов мышц для подтверждения диагноза. Выявлено отсутствие белка-дисферлина во всех случаях, что позволило установить диагноз дисферлинопатия.

Метод NGS позволяет эффективнее выявлять изменения в гене *DYSF* и сокращать длительность обследования пациентов и сроки установления точного диагноза.

Секвенирование по Сэнгеру и MLPA используются у пациентов с дисферлинопатией для подтверждения диагноза [14, 15]. Отсутствие дисферлина, зарегистрированное при иммуногистохимическом исследовании,

также позволяет подтвердить, что причиной клинических проявлений у данных пациентов является дефицит белка в скелетной мускулатуре.

Таким образом, диагностика дисферлинопатий остается актуальной проблемой, требующей комплексного подхода и внедрения в диагностический процесс новых высокотехнологичных методов, таких как NGS.

Литература

1. Чернова О.Н., Мавликеев М.О., Зейналова А.К. с соавт. Репаративный рабдомиогистогенез у мышечей, мутантных по гену *DYSF*. *Гены и клетки* 2019; 14(2): 32-39.
2. Царгуш В.А., Бардаков С.Н., Багненко С.С. с соавт. Магнитно-резонансный паттерн изменений мышц тазового пояса и нижних конечностей у пациентов с дисферлинопатиями. *Лучевая диагностика и терапия* 2020; 11(1): 93-105.
3. Guglieri M., Magri F., D'Angelo M.G. et al. Clinical, molecular, and protein correlations in a large sample of genetically diagnosed Italian limb girdle muscular dystrophy patients. *Hum Mutat.* 2008; 29(2): 258–266.
4. Бардаков С.Н., Емелин А.М., Никитин С.С., и др. Причины ложной диагностики полимиозита у пациентов с дисферлинопатией: клинический случай. *Нервно-мышечные болезни.* 2022;12(4):73-87.
5. Bushby K.M. Making sense of the limb-girdle muscular dystrophies. *Brain.* 1999;122(8):1403–1420.
6. Diers A., Carl M., Stoltenburg-Didinger G. et al. Painful enlargement of the calf muscles in limb girdle muscular dystrophy type 2B (LGMD2B) with a novel compound heterozygous mutation in *DYSF*. *Neuromuscular Disorders.* 2007;17(2):157–162.
7. Landrum M.J., Lee J.M., Benson M. et al. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res.* 2018.
8. Vilchez J.J., Gallano P., Gallardo E. et al. Identification of a Novel Founder Mutation in the *DYSF* Gene Causing Clinical Variability in the Spanish Population. *Archives of Neurology.* 2005;62(8):1256.
9. Cagliani R., Fortunato F., Giorda R. et al. Molecular analysis of LGMD-2B and MM patients: identification of novel *DYSF* mutations and possible founder effect in the Italian population. *Neuromuscular Disorders.* 2003;13(10):788–795.
10. Leshinsky-Silver E., Argov Z., Rozenboim L. et al. Dysferlinopathy in the Jews of the Caucasus: A frequent mutation in the dysferlin gene. *Neuromuscular Disorders.* 2007;17(11-12):950–954.
11. Illarioshkin S.N., Ivanova-Smolenskaya I.A., Greenberg C.R. et al. Identical dysferlin mutation in limb-girdle muscular dystrophy type 2b and distal myopathy. *Neurology.* 2000;55(12):1931–1933.
12. Коновалов Ф.А., Федотов В.П., Умаханова З.Р. и соавт. Молекулярная диагностика наследственных миопатий методом полноэкзомного секвенирования. *Медицинская генетика.* 2015;14(3):18-19
13. Ampleeva M., Tolmacheva E., Komarkov I. et al. NGS-based testing in diagnostics of hereditary neuro-muscular disorders: observations on a large cohort from a clinical bioinformatician's perspective. *Eur J Hum Genet.* 2020. <https://www.nature.com/articles/s41431-020-00739-z>.
14. Шаркова И.В., Дадали Е.Л. Клинико-генетические характеристики и алгоритм дифференциальной диагностики прогрессирующих мышечных дистрофий, манифестирующих после периода нормального моторного развития. *Нервно-мышечные болезни.* 2023;13(1):44-51.

15. Шагина О.А., Рыжкова О.П., Чухрова А.Л., и др. Применение экзомного секвенирования для диагностики наследственных моторно-сенсорных нейропатий. Нервно-мышечные болезни. 2020;10(4):12-26.
16. Miller D.T., Lee K., Abul-Husn N.S., et al. ACMG SF v3.1 list for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing: A policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). Genet Med. 2022;24(7):1407-1414.
17. Harris E., Bladen C.L., Mayhew A. et al. The Clinical Outcome Study for dysferlinopathy: An international multicenter study. Neurol Genet. 2016;2(4):89.
18. Nguyen K., Bassez G., Bernard R. et al. Dysferlin mutations in LGMD2B, Miyoshi myopathy, and atypical dysferlinopathies. Hum Mutat. 2005;26:165.
19. Nguyen K., Bassez G., Krahn M. et al. 2. Phenotypic study in 40 patients with dysferlin gene mutations: high frequency of atypical phenotypes. Arch Neurol. 2007;64(8):1176-1182.
20. Aoki M., Liu J., Richard I. et al. Genomic organization of the dysferlin gene and novel mutations in Miyoshi myopathy. Neurology. 2001;57(2):271-278.
21. Cagliani R., Magri F., Toscano A. et al. Mutation finding in patients with dysferlin deficiency and role of the dysferlin interacting proteins annexin A1 and A2 in muscular dystrophies. Hum Mutat. 2005;26(3):283.
22. Cacciottolo M., Numitone G., Aurino S. et al. Muscular dystrophy with marked Dysferlin deficiency is consistently caused by primary dysferlin gene mutations. European Journal of Human Genetics. 2011;19(9):974-980.
23. Jin S.Q., Yu M., Zhang W. et al. Dysferlin Gene Mutation Spectrum in a Large Cohort of Chinese Patients with Dysferlinopathy. Chin Med J (Engl). 2016;129(19):2287-2293.
8. Vilchez J.J., Gallano P., Gallardo E. et al. Identification of a Novel Founder Mutation in the DYSF Gene Causing Clinical Variability in the Spanish Population. Archives of Neurology. 2005;62(8):1256.
9. Cagliani R., Fortunato F., Giorda R. et al. Molecular analysis of LGMD-2B and MM patients: identification of novel DYSF mutations and possible founder effect in the Italian population. Neuromuscular Disorders. 2003;13(10):788-795.
10. Leshinsky-Silver E., Argov Z., Rozenboim L. et al. Dysferlinopathy in the Jews of the Caucasus: A frequent mutation in the dysferlin gene. Neuromuscular Disorders. 2007;17(11-12):950-954.
11. Illarioshkin S.N., Ivanova-Smolenskaya I.A., Greenberg C.R. et al. Identical dysferlin mutation in limb-girdle muscular dystrophy type 2b and distal myopathy. Neurology. 2000;55(12):1931-1933.
12. Konovalov F.A., Fedotov V.P., Umakhanova Z.R. et al. Molekulyarnaya diagnostika nasledstvennykh miopatiy metodom polnoekzomnogo sekvenirovaniya [Molecular diagnostics of hereditary myopathies by full-exome sequencing]. Meditsinskaya Genetika [Medical Genetics]. 2015;14(3):18-19. (In Russ.)
13. Ampleeva M., Tolmacheva E., Komarkov I. et al. NGS-based testing in diagnostics of hereditary neuro-muscular disorders: observations on a large cohort from a clinical bioinformatician's perspective. Eur J Hum Genet. 2020. <https://www.nature.com/articles/s41431-020-00739-z>.
14. Sharkova I.V., Dadali E.L. Kliniko-geneticheskiye kharakteristiki i algoritm differentsial'noy diagnostiki progressivnykh myshchennykh distrofiy, manifestiruyushchikh posle perioda normal'nogo motornogo razvitiya [Clinical and genetic characteristics and an algorithm for the differential diagnosis of progressive muscular dystrophies that manifest after a period of normal motor development]. Nervno-myshechnyye bolezni [Neuromuscular Diseases]. 2023;13(1):44-51. (In Russ.)
15. Shchagina O.A., Ryzhkova O.P., Chukhrova A.L., et al. Primeneniye ekzomnogo sekvenirovaniya dlya diagnostiki nasledstvennykh motorno-sensornykh neyropatiy [Diagnostic utility of exome sequencing for inherited peripheral neuropathies]. Nervno-myshechnyye bolezni [Neuromuscular Diseases]. 2020;10(4):12-26. (In Russ.)
16. Miller D.T., Lee K., Abul-Husn N.S., et al. ACMG SF v3.1 list for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing: A policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). Genet Med. 2022;24(7):1407-1414.
17. Harris E., Bladen C.L., Mayhew A. et al. The Clinical Outcome Study for dysferlinopathy: An international multicenter study. Neurol Genet. 2016;2(4):89.
18. Nguyen K., Bassez G., Bernard R. et al. Dysferlin mutations in LGMD2B, Miyoshi myopathy, and atypical dysferlinopathies. Hum Mutat. 2005;26:165.
19. Nguyen K., Bassez G., Krahn M. et al. 2. Phenotypic study in 40 patients with dysferlin gene mutations: high frequency of atypical phenotypes. Arch Neurol. 2007;64(8):1176-1182.
20. Aoki M., Liu J., Richard I. et al. Genomic organization of the dysferlin gene and novel mutations in Miyoshi myopathy. Neurology. 2001;57(2):271-278.
21. Cagliani R., Magri F., Toscano A. et al. Mutation finding in patients with dysferlin deficiency and role of the dysferlin interacting proteins annexin A1 and A2 in muscular dystrophies. Hum Mutat. 2005;26(3):283.
22. Cacciottolo M., Numitone G., Aurino S. et al. Muscular dystrophy with marked Dysferlin deficiency is consistently caused by primary dysferlin gene mutations. European Journal of Human Genetics. 2011;19(9):974-980.
23. Jin S.Q., Yu M., Zhang W. et al. Dysferlin Gene Mutation Spectrum in a Large Cohort of Chinese Patients with Dysferlinopathy. Chin Med J (Engl). 2016;129(19):2287-2293.

References

1. Chernova O.N., Mavlikeev M.O., Zeynalova A.K., et al. Reparativnyy rabdomyogenez u myshey, mutantnykh po genu DYSF [Reparative rhabdomyogenesis in mice with DYSF mutation]. Geny i kletki [Genes and cells]. 2019;14(2):32-39. (In Russ.)
2. Tsargush V.A., Bardakov S.N., Bagnenko S.S. et al. Magnitno-rezonansnyy pattern izmeneniy myshts tazovogo poyasa i nizhnikh konechnostey u patsiyentov s disferlinopatiyami [MRI pattern changes in pelvic muscle and lower limb in patients with dysferlinopathy]. Luchevaya diagnostika i terapiya [Diagnostic radiology and radiotherapy]. 2020;11(1):93-105. (In Russ.)
3. Guglieri M., Magri F., D'Angelo M.G. et al. Clinical, molecular, and protein correlations in a large sample of genetically diagnosed Italian limb girdle muscular dystrophy patients. Hum Mutat. 2008;29(2):258-266.
4. Bardakov S.N., Emelin A.M., Nikitin S.S., et al. Prichiny lozhnoy diagnostiki polimiozita u patsiyentov s disferlinopatiyey: klinicheskiy sluchay [Reasons for misdiagnosis of polymyositis in patients with dysferlinopathy: a clinical case]. Nervno-myshechnyye bolezni [Neuromuscular Diseases]. 2022;12(4):73-87. (In Russ.)
5. Bushby K.M. Making sense of the limb-girdle muscular dystrophies. Brain. 1999;122(8):1403-1420.
6. Diers A., Carl M., Stoltenburg-Didinger G. et al. Painful enlargement of the calf muscles in limb girdle muscular dystrophy type 2B (LGMD2B) with a novel compound heterozygous mutation in DYSF. Neuromuscular Disorders. 2007;17(2):157-162.
7. Landrum M.J., Lee J.M., Benson M. et al. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. Nucleic Acids Res. 2018.