

Оценка частоты поясно-конечностной мышечной дистрофии типа 2L в Российской Федерации

Булах М.В., Рыжкова О.П., Дадали Е.Л., Руденская Г.Е., Поляков А.В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр»,
Москва, 115478, ул. Москворечье, д. 1, e-mail: polyakov@med-gen.ru

Поясно-конечностная мышечная дистрофия (ПКМД) типа 2L, обусловленная мутациями в гене *ANO5*, преимущественно распространена в североευропейских странах и в Финляндии. Для европейской популяции известны две мажорные мутации, которые приводят к двум аллельным заболеваниям: ПКМД 2L и мышечной дистрофии Миоши типа 3. Проведен поиск этих мутаций в выборке 480 больных ПКМД из различных регионов РФ. Мутация с.2272C>T обнаружена у одного больного в гомозиготном состоянии и у четырёх — в гетерозиготном. Мутации с.191dupA в выборке больных не выявлено. В единичных случаях обнаружены мутации с.173G>A (p.Arg58Gln) и с.412G>T (p.Gly138Stop) в гетерозиготном состоянии; нонсенс-мутация с.412G>T (p.Gly138Stop) выявлена впервые. Доля ПКМД 2L среди других ПКМД в РФ составляет не менее 0,6%, частота ПКМД 2L в РФ оценена как 1:120000 (доверительный интервал — от 1:20000 до 1:825000).

Ключевые слова: ПКМД 2L, мышечные дистрофии, частота заболевания, *ANO5*

Введение

Поясно-конечностные мышечные дистрофии (ПКМД) — одна из наиболее гетерогенных и клинических полиморфных групп наследственных заболеваний. На настоящий момент выделяют более 30 различных вариантов, большинство из которых наследуются по аутосомно-рецессивному типу (до 85%) [1]. Многие из форм ПКМД были впервые описаны еще в XIX веке, но выделены в отдельные нозологические единицы только в течение последних десятилетий, после того, как были установлены их молекулярно-генетические причины. Одной из таких форм является ПКМД 2L — аутосомно-рецессивное медленно прогрессирующее заболевание, характеризующееся асимметричной атрофией четырехглавой мышцы бедра, двуглавой мышцы плеча и слабостью преимущественно проксимальных мышц нижних конечностей.

Случаи различной по клинической тяжести миопатии квадрицепсов регистрировались в литературе с 1922 г. [2] и на протяжении всего XX века. В 2007 г. группой авторов во главе с J. Jagu были обследованы 14 пациентов из восьми семей франко-канадского происхождения; у всех наблюдались клинические проявления атрофии квадрицепсов, мышечная слабость и миалгии. На основании генеалогического анализа и последующего анализа сцепления полиморфных маркеров в этих семьях был картирован локус заболевания на хромосоме 11 (11p13-p12) [3], а затем в 2010 был идентифицирован ген *ANO5* [4]. Ген состоит из 22 экзонов и кодирует белок, представляющий собой кальций-активируемый хлорный канал (TMEM16E), который принадлежит большому семейству трансмембранных белков. Некоторые авторы полагают, что TMEM16E может играть роль в дисферлин-зависимой репарации мембран мышечных

клеток [4]. Помимо ПКМД 2L рецессивные мутации в гене *ANO5* являются причиной развития дистальной миопатии Миоши типа 3. Доминантные мутации в этом гене приводят к генерализованному скелетному синдрому — гнатодиафизарной дисплазии (ГДД). Для рецессивных мутаций гена *ANO5* не описано генофенотипических корреляций, но характерна изменчивая экспрессивность фенотипических проявлений. Поэтому даже в пределах одной семьи могут сильно варьировать тяжесть мышечной дистрофии в зависимости от объема вовлеченных в патологический процесс групп мышц и возраст манифестации, который колеблется от 11 до 50 лет (средний возраст — 32 года) [3]. Уровень креатинфосфокиназы у больных часто в норме, либо умеренно повышен (254—6000 Ед/л, среднее значение — 1290 Ед/л).

ПКМД 2L преимущественно распространена во франко-канадской популяции и североευропейских странах. В популяции финнов частота этой формы достигает 2:100000 [5], на севере Великобритании — 0,26:100000 [6], в Дании — 1:100000 [7]. В РФ исследование ПКМД 2L до настоящего момента не проводилось.

Исторические данные об обширной ассимиляции финно-угорских народов и населения Руси, начавшейся в XI—XIII столетиях на территории современной РФ [8], а также территориальная близость РФ и Финляндии дают основание предполагать наличие генетического сходства популяций русских и финнов, что было подтверждено сравнительным анализом гаплогрупп Y-хромосомы этих популяций [9, 10]. Поэтому, мутации, характерные для жителей Финляндии, могут встречаться и у больных ПКМД в РФ. Миссенс-мутация с.2272C>T (p.Arg758Cys) — наиболее частая в финской популяции и является причиной возникновения ПКМД 2L в 57%

случаев [5]. Другой мажорной мутацией в европейской популяции является с.191dupA (p.Asn64Lysfs), которая обнаруживается более чем у 30% больных ПКМД 2L, проживающих на севере Великобритании и в Германии [6], а также встречается у финнов и итальянцев [5, 11]. Обе мутации клинически проявляются либо фенотипом ПКМД 2L, либо фенотипом мышечной дистрофии Миоши типа 3.

Целью работы было установление частоты ПКМД 2L в РФ и вклада этой формы в спектр всех ПКМД на основании анализа двух частых мутаций в гене *ANO5* с.191dupA и с.2272C>T в выборке больных ПКМД из РФ.

Материалы и методы

Материалом для исследования являлись образцы ДНК, выделенные из периферической крови 480 неродственных больных с диагнозом *поясно-конечностная мышечная дистрофия*, проживающих в разных регионах РФ. Ранее для части больных исследуемой выборки был проведён поиск мутаций в генах, ответственных за другие формы ПКМД, в результате чего у 72 больных выявлены различные мутации в гене *CAPN3* [12], у 21 — в гене *FKRP* [12], у 18 — в гене *LMNA* [13], у 18 — в гене *EMD* [13], у 6 — в гене *DMD*. В единичных случаях обнаружены мутации в генах *FHL1* [13], *SMN*, *POMT*, *ZNF9*. Непосредственными объектами исследования данной работы стали образцы ДНК 340 больных, для которых диагноз ПКМД не был подтвержден молекулярно-генетическими методами. Контрольную выборку составили 860 образцов ДНК биобанка лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ», полученных от необследованных неродственных жителей различных регионов РФ. Забор биологического материала (жидкая кровь, пятна крови на фильтре) проводился в процедурных кабинетах медико-генетических консультаций разных регионов РФ с информированного согласия всех обследованных лиц, а в случае несовершенности пациентов — с согласия их родителей.

Клинический диагноз ПКМД устанавливался на основании следующих критериев:

- преимущественное поражение мышц тазового и плечевого поясов;
- повышение уровня креатинфосфокиназы;
- первично-мышечный характер поражения на электронейромиограмме.

Для исследования частоты ПКМД 2L в лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ» была разработана медицинская технология «Система детекции в одной пробирке наиболее частых мутаций гена *ANO5*, ответственного за поясно-конечностную мышечную дистрофию 2L типа». Поиск мутаций с.191dupA и с.2272C>T в гене *ANO5* осуществлялся методом мультиплексного ПЦР-ПДАФ и ПДРФ-анализа. Амплификацию всех исследуемых фрагментов ДНК проводили методом ПЦР на программируемом термощиклере «Терцик» фирмы «ДНК-технология» (Россия) с использованием ДНК-полимеразы Biotaq («Биомастер») по стандартному протоколу. Праймеры и условия амплификации, используемые в данной работе, приведены в табл. 1 и 2.

Для дизайна олигонуклеотидных праймеров использована последовательность мРНК гена *ANO5* NCBI Reference Sequence: NM_213599.2. ПДРФ-анализ амплифицированных образцов ДНК проводился по протоколу производителя с использованием эндонуклеазы «HRA II» фирмы «СибЭнзим» (Россия).

Анализ всей кодирующей последовательности и экзон-интронных соединений гена *ANO5* проводился методом прямого автоматического секвенирования продукта ПЦР как с прямого так и с обратного праймеров, на основе ферментативного сиквенса по Сенгеру согласно протоколу фирмы-производителя на приборе ABI Prism 3100 (Applied Biosystems).

Для определения протяжённых делеций/инсерций гена *ANO5* была использована система мультиплексной проба-зависимой лигазной реакции с последующей амплификацией (Multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA), разработанная голландской компанией MRC-Holland. Для лигазной реакции использовался набор SALSA MLPA REAGENT KIT (P 436-A1) [14].

Данные обрабатывали с использованием программного обеспечения Coffalyser V8, также предоставляемого компанией-разработчиком MLPA [14].

Биоинформатический анализ клинической значимости выявленных изменений нуклеотидной последовательности проводился с использованием интернет-ресурсов MutationTaster, Provean, PolyPhen-2 и NetGene2 [15–18].

Для статистической обработки данных применялись пакеты программы Statistica 6.0.

Таблица 1

Праймеры и условия амплификации, применявшиеся для анализа двух частых мутаций с.191dupA и с.2272C>T в гене *ANO5*

Фрагмент	Последовательность праймеров, 5'→3'	t отжига	[MgCl ₂], mM
ANO5 191	F: GTCATTTATGTCTCCTGCAGTTTC	58°C	4
	R: CCCATCTCGGAAGAAGATAGAATC		
ANO5 2272	F: GGTA CTGAGAGATGTACAAATCAGAC	58°C	4
	R: CATTTGTTGAGTAAGCATAGTAGTAACTAGCC		

Праймеры и условия амплификации, применявшиеся для анализа последовательности гена *ANO5*

Фрагмент	Последовательность праймеров, 5'→3'	t отжига	[MgCl ₂], mM
<i>ANO5</i> Ex.1	F: GACCGGGTCGAGTGGAAAGTAC	62°C	4
	R: GGCAGCCAGCCTGGCTCTC		
<i>ANO5</i> Ex.2	F: GACTTTTGAATATGTTCTGATCAGTGGC	62°C	4
	R: GGAACATGGAACCTGCTTTAGCTAC		
<i>ANO5</i> Ex.3	F: CACCCTTTGCTCCACCTGCAC	55°C	2
	R: GAACTGGAAGAGATATCATCATTGC		
<i>ANO5</i> Ex.4	F: CTGTAATTCTGGGCAGGAAGTGC	62°C	4
	R: CCACTGCAGCCATTGAGAGC		
<i>ANO5</i> Ex.5	F: GTTGCTGAAAACCTCTGGTTATTTGTC	62°C	4
	R: GTAACACTTCAGGGCCTCTCAC		
<i>ANO5</i> Ex.6	F: GTATATTGAATCTGTCAATACTGAGC	64°C	4
	R: GAGTCTATCCAGGCAAAGGC		
<i>ANO5</i> Ex.7	F: CTCAATAACAACTGATCAGTAAGC	62°C	4
	R: CTCGTATTTGAAGGGATGTGC		
<i>ANO5</i> Ex.8	F: GAAAGAAATGTGGAAAGCATAAAGTTC	62°C	4
	R: GCAACTGAAGTAAAGGAAGATTCTCTC		
<i>ANO5</i> Ex.9	F: GAACAGCAGTGTTTATTTACTTCGTC	62°C	4
	R: CACATTATCAAGTTTAAATTGGTCTGATC		
<i>ANO5</i> Ex.10	F: GGCTCCAGACTATAACATTCTTCC	62°C	4
	R: GCACAAGATAAAGATGTTTTCTCTATC		
<i>ANO5</i> Ex.11-12	F: GGACTTTTACCTAAACACCTATCAC	62°C	4
	R: CATTTGGTATGTAAGATATTTTCATCTGTC		
<i>ANO5</i> Ex.13	F: GTGAACCATCCTGCAACCAAAG	62°C	4
	R: GCAGTGTGTCCATTGAGATATGC		
<i>ANO5</i> Ex.14	F: GGCTCTGTGATATTGACTAGTGC	62°C	4
	R: CTGTTGAGATAGCTCATTTAATCAC		
<i>ANO5</i> Ex.15	F: CAGAGATACAGAGACCCAAATAGC	62°C	4
	R: CTGATCCAAAATAGACATATAGCATC		
<i>ANO5</i> Ex.16	F: GTTCACTTGTCTAGGGAGTAC	62°C	4
	R: GTTGTTAATACTGAGGTATTGAAGCTAC		
<i>ANO5</i> Ex.17	F: GTGTTGCAAAATTCATCTTTGATC	62°C	4
	R: CTAAACATTTTCTAACAAAGGCACC		
<i>ANO5</i> Ex.18	F: GCTAACACTCTGATTCTCTGATCGC	62°C	4
	R: GCTGAAAAACCACTCATTGATGC		
<i>ANO5</i> Ex.19	F: GTGTTCCCTGTCTTTCTCCTTCAC	62°C	4
	R: GTAAAGATTAAGCATCATTGACATCTC		
<i>ANO5</i> Ex.20	F: GGTACTGAGAGATGTACAAATCAGAC	62°C	4
	R: GATTTTTGTTGCCCTAAGAAAATCC		
<i>ANO5</i> Ex.21	F: GAGGTCTCTCTAGTTGAAGCTATAAC	62°C	4
	R: GAGGTTACCTTTAGAAATATCTGCC		

Результаты

Методом ПЦР-ПДРФ и ПДАФ-анализа проанализированы образцы ДНК 340 неродственных больных ПКМД из РФ на наличие двух мутаций в гене *ANO5*. Мутация с.2272C>T обнаружена у 5 больных на 6 хромосомах. У одного больного миссенс-мутация выявлена в гомозиготном состоянии, а у четырех — в гетерозиготном. На электрофореграмме продукт ПЦР-ПДРФ-анализа при наличии в образце ДНК большого мутации с.2272C>T в гетерозиготном состоянии представлен на дорожке 10 (рис. 1).

Мутация с.191dupA в выборке больных не была обнаружена.

На основании полученных результатов медицинская технология «Система детекции в одной пробирке наиболее частых мутаций гена *ANO5*, ответственного за поясно-конечностную мышечную дистрофию 2L типа» внедрена в диагностическую практику ФГБНУ «МГНЦ».

На следующем этапе методом прямого автоматического секвенирования по Сенгеру у четырех гетерозиготных носителей мутации с.2272C>T проведено исследование всей кодирующей последовательности гена *ANO5*. У двух больных выявлены мутации с.412G>T (p.Gly138Stop) и с.173G>A (p.Arg58Gln) в гетерозиготном состоянии (рис. 2).

У двух других пробандов, для которых секвенирование кодирующей области и экзон-интронных соединений гена *ANO5* оказалось нерезультативным, был проведён поиск протяженных делеций/инсерций в гене *ANO5* методом мультиплексной пробзависимой лигазной реакции (MLPA). Графические результаты проведенного анализа, представляющие собой паттерн сигналов разной амплитуды, характеризующей число копий соответствующего фрагмента ДНК, представлены на рис. 3. По итогам компьютерной обработки установлено отсутствие протяженных делеций/инсерций у обоих пробандов (рис. 4).

При исследовании контрольной выборки мутация с.2272C>T обнаружена у 5 из 860 чел. в гетерозиготном состоянии. Следовательно, 1 из 172 жителей РФ является популяционным носителем данной замены, а частота мутантного аллеля в популяции составляет 0,003. Полученная частота популяционного носительства мутации с.2272C>T в РФ сравнима с результатами поиска этой мутации в выборке больных, где из 340 обследованных больных выявлено 2 гетерозиготных носителя искомой мутации (1:170). Отсюда следует, что эти двое больных являются популяционными носителями мутации с.2272C>T.

Таким образом, в исследуемой выборке выявлено трое больных ПКМД 2L. По итогам работы доля ПКМД 2L в выборке больных ПКМД составляет не менее 0,006 (0,6%). Исходя из частоты популяционного носительства мутации с.2272C>T, оценочная частота ПКМД 2L

в РФ составляет не менее 1:120000 с доверительным интервалом от 1:20000 до 1:825000.

В ходе исследования у 50 больных в выборке ПКМД была обнаружена делеция с.2236-20_2236-17delTTTT с аллельной частотой 7,4%, зарегистрированная в базе dbSNP (rs765794428) без указания аллельной частоты и данных относительно патогенности. Биоинформатический анализ с использованием интернет-ресурса NetGene2 не выявил каких-либо значимых изменений донорных и акцепторных сайтов сплайсинга, что позволяет отнести с.2236-20_2236-17delTTTT к категории полиморфизмов.

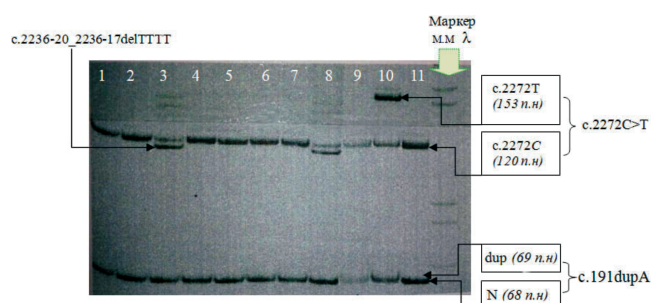


Рис. 1. Система идентификации двух частых мутаций с.191dupA и с.2272C>T в гене *ANO5* методом ПЦР-ПДРФ-анализа.

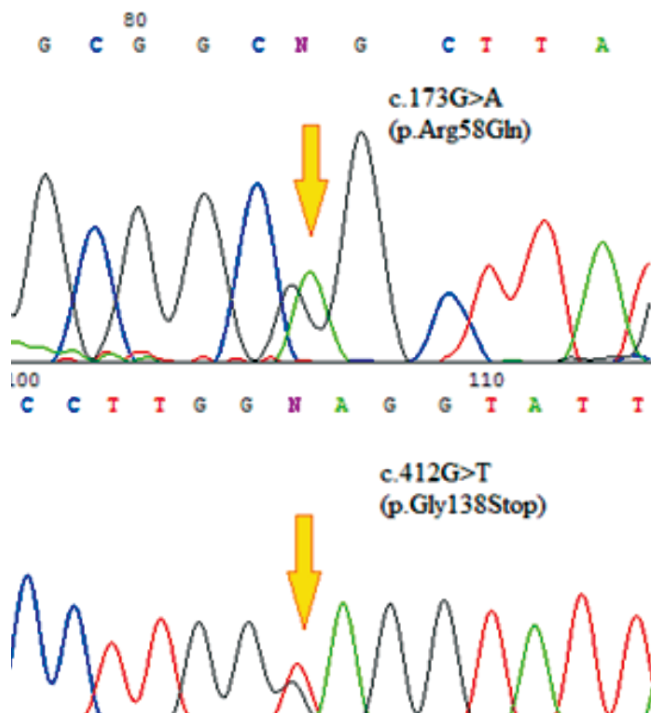


Рис. 2. Фрагменты результатов прямого автоматического секвенирования области и экзона 4 (сверху) и экзона 7 (снизу) гена *ANO5*, стрелками обозначены мутации с.173G>A и с.412G>T в гетерозиготном состоянии.

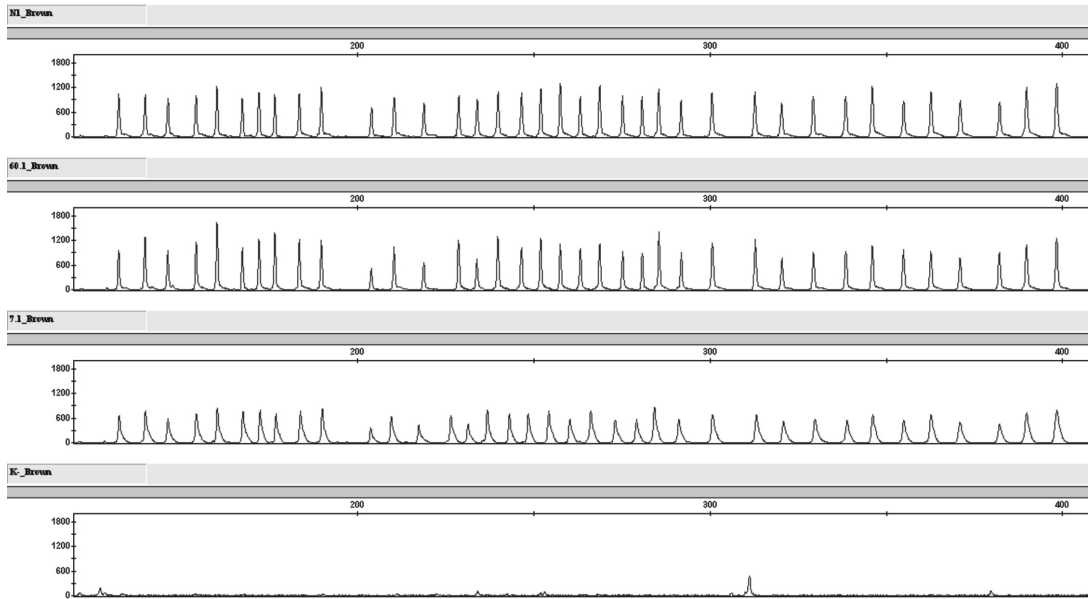


Рис. 3. Фрагментный анализ продукта реакции MLPA на приборе ABI Prism 3130 «AppliedBiosystems»), где N1 — контрольный образец здорового человека; 60.1 — пробанд №1; 7.1 — пробанд №2; К- — отрицательный контроль

		Probe target info	AllSamples		ReferenceSample	
			7.1 Bro...	60.1 Bro...	N1 Bro...	N2 Bro...
FRSS (n=7)		n/a	100%	100%	90%	90%
CAS (n=5)	FMRS	n/a	100%	100%	100%	100%
	PSLP - Relati...	n/a	OK	OK	OK	OK
	FSLP - Relati...	n/a	OK	OK	OK	OK
	RSQ - Refere...	n/a	OK	OK	OK	OK
	RPQ - Refere...	n/a	OK	OK	OK	OK
11p (n=28)	ANO5-1	11-022,171489	0.98	1.03	0.99	1.01
	ANO5-1	11-022,171566	0.96	1	1	1.04
	ANO5-2	11-022,181905	1.01	1.09	1.03	0.89
	ANO5-3a	11-022,189358	0.98	1	0.99	1.03
	ANO5-4	11-022,196369	0.99	0.99	0.97	1.06
	ANO5-5 (MUT)	11-022,199192	0	0	0	0
	ANO5-5 (WT)	11-022,199192	0.96	0.99	0.98	1.09
	ANO5-6	11-022,204102	0.94	1	1.01	1.06
	ANO5-7	11-022,205414	1.03	1.01	1.01	0.96
	ANO5-7	11-022,205474	1	1.09	1	0.92
	ANO5-8	11-022,214335	0.99	1.03	0.98	1
	ANO5-9	11-022,217665	1.06	1.02	0.99	0.94
	ANO5-10	11-022,228396	1.05	1.16	1	0.84
	ANO5-11	11-022,228814	1	0.97	0.98	1.05
	ANO5-12	11-022,229105	1.07	1.07	0.97	0.92
	ANO5-13	11-022,233532	1.01	0.99	1	1.01
	ANO5-14	11-022,235749	0.98	0.99	1	1.03
	ANO5-15	11-022,237660	1.01	1.02	1	0.98
	ANO5-16	11-022,240334	1.02	1.09	0.98	0.92
	ANO5-17	11-022,241045	0.99	1.06	0.99	0.97
	ANO5-18	11-022,248459	0.99	1.02	0.99	1
	ANO5-19	11-022,250937	1.02	1.03	1.02	0.94
	ANO5-19	11-022,251032	0.97	0.97	1.01	1.05
	ANO5-20	11-022,252741	0.98	0.98	1	1.05
	ANO5-21	11-022,254213	0.96	0.94	1.02	1.09
	ANO5-22	11-022,257811	0.95	0.97	1.01	1.08
	ANO5-22	11-022,258166	1	1.05	0.98	0.97
	ANO5-22	11-022,259670	0.98	1	1.03	0.99
References...	Reference*	01-158,359702	0.97	0.93	0.99	1.14
	Reference*	02-165,907154	1.02	1	1	0.98
	Reference*	03-038,624633	0.99	0.93	1	1.08
	Reference*	04-123,596999	0.95	0.95	1	1.12
	Reference*	05-132,037607	1.05	1.09	0.99	0.89
	Reference*	06-065,653303	1	1.02	1	0.98
	Reference*	08-024,867611	1	1	0.98	1.02
	Reference*	12-006,026214	1.05	1	1	0.96
	Reference*	19-059,317733	0.96	0.94	1.04	1.07
	Reference*	21-042,049968	1	1.04	1.02	0.94

Рис. 4. Результаты обработки числовых параметров фрагментарного анализа продукта реакции MLPA с использованием программы Coffalyser V8.

Обсуждение

В результате проведенного исследования в выборке больных ПКМД из РФ троим больным молекулярно-генетическими методами установлен диагноз ПКМД 2L (табл. 3).

Мутация с.2272C>T также найдена еще у двух больных в гетерозиготном состоянии. Поиск у них второй мутации всеми возможными методами результатов не дал. Тем не менее, наличие у этих больных мутации в гене, ответственном за формирование ПКМД, и клинического фенотипа ПКМД не исключало существования у них аллельной мутации в промоторных и регуляторных областях гена *ANO5*. Для подтверждения или исключения данной гипотезы проведен поиск миссенс-мутации с.2272C>T в контрольной выборке (n = 860). Частота носительства этой мутации оказалась практически идентичной в выборке больных (1:170) и контрольной (1:172) выборке. Следовательно, с высокой степенью достоверности можно утверждать, что эти двое больных являются популяционными носителями выявленной мутации, а развитие ПКМД у них обусловлено иным молекулярно — генетическим дефектом.

В Финляндии, по данным консорциума по секвенированию экзомов ExAC, частота популяционного носительства мутации с.2272C>T составляет 1 на 138 — чуть выше, чем в популяции РФ (1:172) [19]. Частота носительства мутантного аллеля с.2272T в российской популяции (0,003) сравнима с таковой у финнов (0,0036), а у остальных европейцев она на порядок ниже (0,0004) [19]. В популяции азиатов и африканцев данная мутация не встречается вовсе.

Следует отметить, что мутация с.191dupA, распространенная в европейской популяции, в выборке больных из РФ не найдена. Если эта мутация и встречается в популяции РФ, то весьма редко, и могла быть не обнаружена ввиду недостаточной численности выборки (n = 480).

Нонсенс-мутация с.412G>T (Gly138Stop) в гене *ANO5*, обнаруженная в исследуемой выборке у одного больного, выявлена впервые и ранее в литературе и базах данных (HGMD, dbSNP) описана не была. Проверить семейный характер мутации или происхождение ее *de novo* в данном случае оказалось невозможно в связи с недоступностью биологического материала родителей или родственников пробанда.

Нуклеотидная замена с.173G>A (p.Arg58Gln) описана в dbSNP (rs749698519), но какая-либо информация относительно ее клинической значимости отсутствует.

По данным ExAC, частота мутантного аллеля с.173A в популяции южных азиатов составляет 0.00030, в популяции латиноамериканцев — 0,00009, среди других популяций данный аллель не встречается [19]. Анализ клинической значимости выявленной нуклеотидной замены с использованием программ предсказания последствий нуклеотидных изменений MutationTaster, Provean, Sift, PolyPhen-2 показал неоднозначные результаты относительно ее патогенности (MutationTaster — disease causing, Sift — Tolerated, Provean — Neutral, PolyPhen — probably damaging). Для уточнения клинической значимости замены с.173G>A проведено популяционное исследование контрольной выборки 110 неродственных необследованных жителей РФ (220 хромосом). В контрольной выборке искомой замены не обнаружено, что свидетельствует в пользу патогенности выявленной нуклеотидной замены.

Доля ПКМД 2L в выборке больных ПКМД из РФ, которая в нашем случае составила не менее 0,6%, оказалась ниже, чем в европейских популяциях. У итальянцев этот показатель чуть выше 2%, в Саудовской Аравии — 3,1%, в Великобритании — 11,4%, в популяции финнов — самый высокий, из всех, описанных в литературе — около 25% [11, 20—22].

Необходимо уточнить, что доля ПКМД 2L в РФ, полученная в данной работе, рассчитывалась только на основании анализа двух «частых» мутаций гена *ANO5* и последующего поиска второй мутации во всей кодирующей последовательности гена *ANO5* у гетерозиготных носителей одной из «частых» мутаций. Поэтому этот показатель является оценочным и минимальным. Выявленные в ходе исследования мутации с.412G>T и с.173G>A, согласно данным литературы, до настоящего момента не встречавшиеся у пациентов с ПКМД в мире, свидетельствуют о возможных различиях спектров мутаций гена *ANO5* у европейцев и россиян. Можно предположить, что при анализе всей кодирующей последовательности гена *ANO5* в исследуемой выборке больных методом прямого автоматического секвенирования доля ПКМД 2L будет выше.

Частота ПКМД 2L в РФ также является оценочной вследствие ее расчета на основании результатов популяционного исследования всего одной «частой» мутации гена *ANO5* (с.2272C>T) и составляет не менее 1:120000. Это выше, чем в Великобритании (0,26:100000), где она является третьей по частоте после ПКМД 2A и ПКМД 2I, сравнима с частотой ПКМД 2L в Дании (1:100000), но более чем в два раза ниже, чем в Финляндии (1:50000). На настоящий момент сложно сказать, явля-

Таблица 3

Генотипы больных ПКМД 2L типа в РФ

№	Нуклеотидная замена	Аминокислотная замена
C257	с.2272C>T / с.2272C>T	p.Arg758Cys / p.Arg758Cys
C299	с.2272C>T / с.412G>T	p.Arg758Cys / p.Gly138Stop

ется ли ПКМД 2L превалирующей формой ПКМД в Финляндии, так как в литературе не имеется данных о распространенности других форм ПКМД в этом регионе, но она, очевидно, является одной из наиболее частых. В РФ двумя самыми частыми формами ПКМД по-прежнему остаются ПКМД 2A и 2I, которые обуславливают 43% и 10% всех случаев ПКМД соответственно [23, 24].

В отличие от ряда североευропейских стран, где высокую распространенность ПКМД 2L связывают с изолированностью популяций и эффектом основателя, в РФ данная форма ПКМД встречается редко. Тем не менее, территориальная и историческая близость русских и финнов, вероятно, способствовала распространению «финской» мутации с.2272C>T, а, следовательно, и ПКМД 2L в РФ. Поэтому для больных, у которых исключены другие, более частые в РФ, формы ПКМД, либо имеется четко выраженный фенотип ПКМД 2L или же прослеживаются финские/североευропейские корни, поиск мутаций в гене *ANO5* является целесообразным.

Список литературы

1. Nigro V., Savarese M. Genetic basis of limb-girdle muscular dystrophies: the 2014 update. *Acta Myologica*, 2014; XXXIII: 1-12.
2. Bramwell E. Observations on myopathy: symmetrical atrophic paresis of the quadriceps muscles of probable myopathic origin. *Proc R Soc Med*. 1922; Vol.16: 1-3.
3. Jarry J., Rioux M.F., Bolduc V., Robitaille Y., Khoury V., Thiffault I., Tetreault M., Loisel L., Bouchard J.P., Brais B. A novel autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy with quadriceps atrophy maps to 11p13-p12. *Brain*. 2007; 130: 368-380
4. Bolduc V., Marlow G., Boycott KM, et al. Recessive mutations in the putative calcium-activated chloride channel anoctamin 5 cause proximal LGMD2L and distal MMD3 muscular dystrophies. *Am J Hum Genet*. 2010; 86: 213-221.
5. Penttilä S., Palmio J., Suominen T., Raheem O., Evila A., Muelas Gomez N., Tasca G., Waddell L. B., Clarke N. F., Barboi A., Hackman P., Udd B. Eight new mutations and the expanding phenotype variability in muscular dystrophy caused by ANO5. *Neurology*. 2012; 78: 897-903. Note: Erratum: *Neurology*. 2013; 80: 226
6. Hicks D., Sarkozy A., Muelas N., Koehler K., Huebner A., Hudson G., Chinnery PF, Barresi R., Eagle M., Polvikoski T., Bailey G., Miller J., Radunovic A., Hughes PJ, Roberts R., Krause S., Walter MC, Laval SH, Straub V., Lochmuller H., Bushby K. A founder mutation in anoctamin 5 is a major cause of limb-girdle muscular dystrophy. *Brain*. 2011;134:171-82.
7. Witting N., Duno M., Petri H., Krag T., Bundgaard H., Kober L., Vissing J. Anoctamin 5 muscular dystrophy in Denmark: prevalence, genotypes, phenotypes, cardiac findings, and muscle protein expression. *J Neurol*. 2013; 260:2084-2093.
8. Рябинин Е.А. Финно-угорские племена в составе древней Руси. — СПб.: Изд-во С.-Петербург. университета, 1997.
9. Oleg Balanovsky, Siiri Rootsi, Andrey Pshenichnov, Toomas Kivisild, Michail Churnosov, Irina Evseeva, Elvira Pocheshkhova, Margarita Boldyreva, Nikolay Yankovsky, Elena Balanovska, Richard Villens. Two Sources of the Russian Patrilineal Heritage in Their Eurasian Context. *Am J Hum Genet*. 2008 Jan 10; 82(1): 236-250.
10. Tuuli Lappalainen, Satu Koivumäki, Elina Salmela, Kirsi Huoponen, Pertti Sistonen, Marja-Liisa Savontaus, Paivi Lahermo. Regional differences among the Finns: A Y-chromosomal perspective. *Gene*. 2006; 376: 207-215.
11. Francesca Magri, Roberto Del Bo, Maria Grazia D'Angelo, Monica Sciacco, Sandra Gandossini, Alessandra Govoni, Laura Napoli, Patrizia Ciscato, Francesco Fortunato, Erika Brighina, Sara Bonato, Andreina Bordoni, Valeria Lucchini, Stefania Corti, Maurizio Moggio, Nereo Bresolin, and Giacomo Pietro Comi. Frequency and characterisation of anoctamin 5 mutations in a cohort of Italian limb-girdle muscular dystrophy patients. *Neuromuscul Disord*. 2012 Nov; 22(11): 934-943.
12. Рыжкова О.П. Клинико-молекулярно-генетический анализ изолированных поясно-конечностных мышечных дистрофий, являющихся ферментопатиями: Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — М., 2011. — 23 с.
13. Адян Т.А. Клинико-генетическое разнообразие и молекулярная диагностика мышечной дистрофии Эмери — Дрейфуса: Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — М., 2015. — 24 с.
14. <http://mrc-holland.com>
15. <http://www.mutationtaster.org/>
16. <http://provean.jcvi.org/index.php>
17. <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml>
18. <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2>
19. Exome Aggregation Consortium (ExAC) (<http://exac.broadinstitute.org/>)
20. Omar A. Mahmood, Xin Mei Jiang Limb-girdle muscular dystrophies: Where next after six decades from the first proposal. *Molecular medicine reports*. 2014; 9: 1515-1532.
21. Fiona L.M. Norwood, Chris Harling, Patrick F. Chinnery, Michelle Eagle, Kate Bushby, Volker Straub. Prevalence of genetic muscle disease in Northern England: in-depth analysis of a muscle clinic population. *Brain*. 2009 Nov; 132: 3175-3186.
22. Bohlega S., Monies D.M., Abulaban A.A., Murad H.N., Al-hindi H.N., Meyer B.F. Clinical and genetic features of anoctaminopathy in Saudi Arabia. *Neurosciences (Riyadh)*. 2015 Apr; 20(2):173-7.
23. Рыжкова О.П., Дадали Е.Л., Руденская Г.Е., Поляков А.В. Частота кальпаинопатии и причина распространенности мутации с.550delA в РФ. *Медицинская генетика*. 2013; 5: 29-34.
24. Рыжкова О.П., Дадали Е.Л., Руденская Г.Е., Комарова Н.В., Поляков А.В. Частота поясно-конечностной дистрофии типа 2I в Российской Федерации. *Медицинская генетика*. 2013; 8: 2-31.

Информация о конфликте интересов

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

The estimated prevalence of limb-girdle muscular dystrophy 2L in Russian Federation

Bulakh M.V., Ryhkova O.P., Dadaly E.L., Rudenskaya G.E., Polyakov A.V.

Federal State Budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics»,
115409, Moscow, Moskvorechie 1, e-mail: polyakov@med-gen.ru

Limb-girdle muscular dystrophy (LGMD) 2L is caused by mutations in the *ANO5* gene and is predominantly distributed in Northern Europe and Finland. There are two major mutations in European population: c.191dupA (p.Asn64Lysfs) and c.2272C>T (p.Arg758Cys), which leading to LGMD 2L and Miyoshi muscular dystrophy, type 3. These two common mutations were analyzed in the cohort of Russian LGMD patients comprising 480 samples from different areas of Russian Federation. Four patients were heterozygous and one patient was homozygous for the c.2272C>T mutation. The c.191dupA mutation wasn't found. A c.173G>A (p.Arg58Gln) mutation and a novel c.412G>T (p.Gly138Stop) mutation were identified in heterozygous status in one case each. LGMD 2L accounts at least 0,6% in a Russian LGMD cohort. The prevalence of LGMD2L in Russian Federation was estimated at least 1:120000 with 95% confidence intervals of 1:20000 to 1:825000.

Key words: LGMD 2L, muscular dystrophies, disease prevalence, *ANO5*