

**РАЗДЕЛ 3.****Другие двигательные расстройства****Генетическая структура аутосомно-доминантных и аутосомно-рецессивных атаксий в российской популяции**

С.А. Ключников, Н.Ю. Абрамычева, А.С. Ветчинова, Е.П. Нужный, М.В. Ершова, С.Н. Иллариошкин

*Научный центр неврологии (Москва)*

Наследственные атаксии (НА) — клинически и генетически крайне гетерогенная группа наследственных нейродегенеративных заболеваний, основной характеристикой которых является эпизодическое или постоянное нарушение координации движений, обусловленное дегенерацией мозжечка и его афферентных и эфферентных нейрональных систем [1]. В настоящее время по механизму передачи в поколениях НА подразделяют на аутосомно-доминантные, аутосомно-рецессивные, X-сцепленные формы, атаксии с митохондриальным типом наследования. Кроме этого также выделяют спорадические формы с неустановленным или неизвестным механизмом генетической передачи.

Распространенность НА составляет около 5–10 случаев на 100000 населения, в частности, аутосомно-доминантных форм — 1–5 на 100000 населения, аутосомно-рецессивных форм — 3 на 100000 [2]. Приведенные цифры позволяют говорить об атаксиях как об одной из наиболее широко распространенных групп среди всех наследственных заболеваний нервной системы, уступающей по своей частоте лишь наследственным нервно-мышечным заболеваниям.

В течение уже более чем 50 лет НА находятся в числе приоритетных направлений научных исследований специалистов отделения наследственных и дегенеративных заболеваний нервной системы Научного центра неврологии (НЦН). На основании многолетних детальных наблюдений семей, отягощенных дегенеративной патологией мозжечковых систем, был описан ряд новых форм данных заболеваний, изучены вопросы фенотипического полиморфизма и биохимических звеньев патогенеза, разработаны новые методы диагностики. С 1994 года, после создания в центре специализированной ДНК-лаборатории, анализ НА вышел на качественно новый уровень, определяющийся использованием наиболее современных молекулярно-генетических технологий, позволяющих изучать генетическую структуру наследственных атаксий в российской популяции и проводить детальный анализ клинико-генетических корреляций, а также осуществлять прямую ДНК-диагностику и профилактику болезни в консультируемых семьях с известным генетическим дефектом. В настоящей статье обобщен многолетний опыт молекулярно-генетической диагностики наследственных аутосомно-доминантных и аутосомно-рецессивных атаксий в Научном центре неврологии.

**Аутосомно-доминантные спиноцеребеллярные атаксии**

Аутосомно-доминантные спиноцеребеллярные атаксии (АД-СЦА) характеризуются прогрессирующей атаксией, возникающей вследствие дегенерации мозжечка, а также, как правило, вовлечением в патологический процесс других отделов центральной и периферической нервной системы, что формирует весьма гетерогенные клинические фенотипы. Первая классификация АД-СЦА, основанная на фенотипических характеристиках, была предложена А. Harding [3]: она выделяла АД-СЦА типа I, характеризующуюся сочетанием мозжечковой симптоматики с пирамидными и экстрапирамидными симптомами, офтальмоплегией, атрофией зрительного нерва, амиотрофией и деменцией, АД-СЦА II типа — сочетание мозжечковой симптоматики с утратой зрения на фоне пигментной дегенерацией сетчатки, а также АД-СЦА III типа с наличием сравнительно изолированной («чистой») мозжечковой атаксии.

С развитием молекулярно-генетических методов диагностики было показано, что столь большое разнообразие клинических фенотипов вызывается мутациями в различных генах. В настоящее время описано свыше 40 генетических форм СЦА [4]. Хронологически первой формой АД-СЦА стала СЦА 1-го типа (СЦА 1) [5], ген которой клонирован в 1993 году. Показано, что данная патология вызывается динамической мутацией — экспансией тринуклеотидных CAG-повторов, кодирующих аминокислоту глутамин, в гене *ATX1* на хромосоме 6p22.3, как и при некоторых других наследственных заболеваниях — болезни Гентингтона, спинально-бульбарной амиотрофии Кеннеди, дентаторубро-паллидолизисовой атрофии (ДРПЛА). Клонирование гена СЦА 1 стало основой для разработки протокола молекулярной диагностики, в том числе и пресимптомного (предиктивного) ДНК-тестирования [6]. В дальнейшем подобные «полиглутаминовые» мутации выявлены при ряде других АД-СЦА (2, 3, 6, 7, 17 типов).

Современная генетическая классификация АД-СЦА по типам, обозначенным порядковыми номерами, весьма сложна и неоднозначна [4]. Некоторые номера в ней пропущены (например, СЦА 9), другие четко очерченные клинические формы АД-СЦА с идентифицированным генным дефектом не имеют номера (например, ДРПЛА). Номера СЦА, как правило, присваивались в соответствии с порядком описания, и позже нередко выяснялось, например, что СЦА 19 и 22, как и СЦА 15 и 16 — одна и та же нозологическая форма. В то же время СЦА 3 была долгое время известна под названием болезнь Мачадо-Джозеф (MJD) (по фамилиям семей, в которых она впервые была диагностирована). Таким образом, в генетической классификации

АД-СЦА имеются «пропущенные» номера, СЦА без номера и СЦА с известными в литературе эпонимическими названиями.

Для части АД-СЦА идентифицированы гены и мутации, для некоторых картированы только аллельные локусы. АД-СЦА, для которых определены гены, ответственные за развитие заболевания, можно разделить на 4 группы [7]:

1. СЦА с экспансией экзонных СAG-повторов, кодирующих патологически длинные полиглутаминовые цепи в транслируемом белке — СЦА 1, 2, 3, 6, 7, 17, ДРПЛА и частично СЦА8.

2. Экспансия микросателлитных повторов в некодирующих участках соответствующих генов — СЦА 10, 12, 31, 36 и частично СЦА 8.

3. Точковые мутации (включая небольшие инсерции и делеции) — СЦА 5, 11, 13, 14, 19/22, 23, 26, 27, 28, 29 и 35.

4. Большие дупликации или делеции — СЦА 15 и, вероятно, СЦА 20.

СЦА 8 попадает в 1-ю и 2-ю группу, поскольку в случае этого заболевания могут реализовываться оба мутационных механизма. Экспансия тринуклеотидных СТG-повторов в нетранслируемом участке гена *ATXN8OS* может приводить к РНК-опосредуемой токсичности, а экспансия СAG-повторов в перекрывающемся гене *ATXN8* может транслироваться в небольшой степени в удлинённые полиглутаминовые цепи.

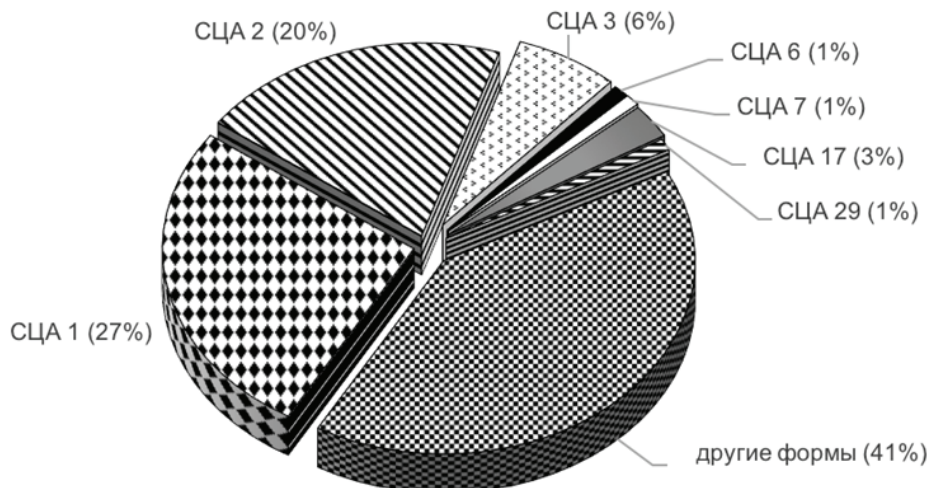
При СЦА с экспансией экзонных СAG-повторов триплетные повторы нестабильны (динамическая мутация), что приводит к увеличению их количества при митозах и мейозах в клетках герминогенного ряда, особенно во время сперматогенеза (который происходит в течение всей жизни, в отличие от яйцеклеток, которые не делятся). Также наблюдается обратная корреляция между количеством СAG-повторов и возрастом начала заболевания, хотя возраст дебюта заболевания у конкретного пациента можно достаточно точно предсказать только в случаях с очень большим количеством повторов. В последующих поколениях заболевание манифестирует раньше и протекает тяжелее, то есть наблюдается феномен антиципации, особенно при передаче патологического гена по отцовской линии [1].

Близкое сходство клинических признаков разных генетических типов АД-СЦА, а также выраженный внутри- и межсемейный фенотипический полиморфизм у различных пациентов создают существенные трудности в постановке клинического диагноза. Ключевыми исследованиями являются магнитно-резонансная томография (МРТ) головного мозга и ДНК-диагностика в тех случаях, когда идентифицирован мутантный ген конкретной формы АД-СЦА.

Истинную распространенность в популяции различных генетических форм АД-СЦА оценить сложно, поскольку количество проведенных широких эпидемиологических исследований при наиболее часто встречающихся типах СЦА до сих пор недостаточно, а редко встречающиеся формы идентифицированы только в единичных семьях. Более половины пациентов, больных СЦА, имеют типы 1, 2, 3, 6 или 7, все остальные встречаются значительно реже [1].

В ДНК-лаборатории НЦН сформирован уникальный банк ДНК 105 российских семей, отягощенных АД-СЦА, ориентированный на молекулярный скрининг и проведение ДНК-диагностики. В обследованной выборке российских семей 91% составили семьи этнических славян (русские, украинцы и белорусы), 9% семей представлены другими национальностями (якуты, буряты, чеченцы и евреи). Учитывая тот факт, что мутации при большинстве наиболее распространенных АД-СЦА относятся к классу «динамических», для проведения молекулярного скрининга были разработаны и оптимизированы методы и протоколы детекции экспансии тринуклеотидных повторов в генах СЦА 1, 2, 3, 6, 7, 8, 12, 17 и ДРПЛА.

При анализе частот различных форм АД-СЦА в нашей выборке обнаружены следующие молекулярные формы: СЦА 1 — в 28 семьях, СЦА 2 — в 21, СЦА 3 — в 7, СЦА 6 — в 1 семье, СЦА 7 — также в 1 семье, СЦА 17 — в 3 семьях, СЦА 29 — в 1 семье. Таким образом, различные генетические формы АД-СЦА идентифицированы в 59% отягощенных российских семей, причем около половины (47%) приходится на долю СЦА 1 и СЦА 2. В 43 семьях (41%) мутаций известных молекулярных форм СЦА не обнаружено, что требует дополнительных молекулярно-генетических исследований. Данные о распространенности различных молекулярных форм СЦА в российской популяции суммированы на рисунке.



**Рисунок.** Распространенность различных генетических форм АД-СЦА в российских семьях.

Полученные нами данные о распространенности различных генетических форм АД-СЦА в большой российской выборке во многом совпадают с результатами итальянских исследователей, обнаруживших превалирование СЦА 1 и СЦА 2 в Италии [8]. В то же время СЦА 3 (болезнь Мачадо–Джозеф) находится по частоте только на 3-м месте (6% всех обследо-

ванных российских семей), являясь весьма редким наследственным заболеванием, что отличает российскую популяцию от многих других популяций большинства европейских стран, США и Японии, в которых СЦА 3 является преобладающей формой СЦА, составляя до 40% всех генетических форм АД-СЦА. Примечательно, что первой формой АД-СЦА, обнаруженной в российской популяции сотрудниками НЦН, была СЦА 1 — наиболее распространенная в России молекулярная форма из данной группы наследственных нейродегенераций [9]. Следует отметить, что в Якутии имеется наиболее обширная в мире серия случаев СЦА 1, а в 88,1% всех якутских семей с НА заболевание представляет собой именно форму СЦА 1 [10].

Анализ клинико-генетических корреляций позволил установить обратную зависимость между числом CAG-повторов и возрастом дебюта СЦА 1, СЦА 2 и СЦА 3. Детальный анализ фенотипов показал, что различные молекулярные формы АД-СЦА, несмотря на сходство клинической картины, имеют характерные фенотипические особенности, в частности СЦА типов 1–3 характеризуются сочетанием мозжечковой, пирамидной и экстрапирамидной симптоматики, в то же время для СЦА 6 более характерно наличие сравнительно изолированного («чистого») мозжечкового синдрома. «Перекрытие» клинической картины заболевания при различных формах АД-СЦА позволяет констатировать невозможность и некорректность попыток точно диагностировать конкретную форму АД-СЦА по данным клиники без сопутствующей ДНК-диагностики. Комплексное клинико-молекулярно-генетическое обследование семей,отягощенных АД-СЦА, позволило проанализировать конкретные случаи с особенностями клинической картины НА. В частности, нами наблюдалась уникальная российская семья с СЦА 2 (3 больных в двух поколениях). Клиническая картина заболевания, ранее не описанная, была представлена в дебюте у всех пациентов симптомами подострой энцефалопатии с галлюцинациями, амнезией, деменцией, эпилептиками у пробанда, трудно отличимой от болезни Альцгеймера и прионных болезней. В дальнейшем присоединялась мозжечково-пирамидная и бульбарная симптоматика с летальным исходом спустя 2–3 года от дебюта заболевания [11]. Недавно нами выявлен первый случай СЦА 17 в российской популяции [12]. Ген, ответственный за развитие заболевания, кодирует ТАТА-бокс-связывающий белок, в связи с этим он получил название *TBP* (ТАТА-binding protein) [13]. Участок с микросателлитными CAG/CAA-повторами, экспансия которых вызывает развитие заболевания, располагается в 3-м экзоне. Границы нормальных значений величины полиглутаминового участка в белке находятся между 25 и 44 аминокислотными остатками. Аллели, вызывающие развитие заболевания, имеют в своем составе 43–63 CAG/CAA-повторов. При этом уровень экспансии 43–49 повторов считается зоной неполной пенетрантности гена. У пациента — мужчины 27 лет, страдающего настоящим заболеванием в течение 7 лет, выявлено гетерозиготное носительство мутантного аллеля в гене *TBP* с количеством CAG/CAA повторов 45. Клиническая картина у пациента — мозжечковая атаксия с эпилептиками без сопутствующих гиперкинезов, дистонии и когнитивного дефицита — соответствует форме заболевания, вызванной мутацией с неполной пенетрантностью (количество CAG/CAA повторов менее 49). В роду пациента подобное заболевание не встречалось, однако при проведении ДНК-диагностики родителей, у здоровой матери больного был найден идентичный мутантный аллель, что ярко демонстрирует явление неполной пенетрантности мутации при данной молекулярной форме АД-СЦА. В дальнейшем наличие СЦА 17 было установлено еще в 2 семьях.

Нами также получен опыт применения технологий секвенирования следующего поколения (NGS) в диагностике редких форм наследственных атаксий. Так, в родословной русского этнического происхождения с аутосомно-доминантной прогрессирующей СЦА с ранним развитием, включавшей 5 пациентов в трех поколениях, с помощью технологии NGS у всех больных выявлена патогенная мутация — замена p.Val1553Met в гене *ITPR1* на хромосоме 3p26.1 (СЦА 29). Данная семья находится под нашим наблюдением свыше 25 лет, и лишь применение высокопроизводительного секвенирования нового поколения помогло поставить точный молекулярный диагноз [14].

Планируется дальнейшее изучение распространенности АД-СЦА в российской популяции, в том числе с применением новейших технологий высокопроизводительного секвенирования.

#### Аутосомно-рецессивные спиноцеребеллярные атаксии

Аутосомно-рецессивные спиноцеребеллярные атаксии (АР-СЦА) — обширная и гетерогенная группа наследственных заболеваний, характеризующихся дегенерацией или нарушением развития мозжечка, поражением спинного мозга и/или периферической нервной системы, аутосомно-рецессивным типом наследования и, в большинстве случаев, дебютом в детском или молодом возрасте. Помимо поражения нервной системы, для данной группы заболеваний характерно вовлечение других органов (сердца, поджелудочной железы, глаз, кожи и др.). При неврологическом осмотре кроме атаксии выявляются другие симптомы поражения нервной системы: полиневропатия, глазодвигательные расстройства, экстрапирамидные и когнитивные нарушения, симптомы поражения пирамидных трактов, эпилептические приступы и другие [1].

АР-СЦА характеризуются широким полиморфизмом клинических проявлений в отношении возраста дебюта, темпа прогрессирования, спектра неврологических и экстраневральных симптомов. Один и тот же фенотип может встречаться при различных заболеваниях, как например при атаксии Фридрейха (АФ) и атаксии с дефицитом витамина Е. С другой стороны, мутации в одних и тех же генах могут приводить к различным фенотипам заболевания с несхожей клинической картиной (дебют АФ в детском и зрелом возрасте, наличие атипичных форм с сохраненными сухожильными рефлексом, спастичностью, атрофией зрительных нервов). Учитывая широкую фенотипическую и генетическую гетерогенность данной группы заболеваний, клиническая верификация диагноза и молекулярная диагностика с выявлением мутаций в конкретных генах весьма затруднительна.

АР-СЦА включают в себя более 60 различных клинических форм, при этом до сих пор не разработана общепринятая генетическая классификация данной группы наследственных заболеваний. Наиболее частой нозологической формой АР-СЦА является АФ. Показано, что в российской популяции АФ встречается в 34,7% среди всех случаев атаксий с аутосомно-ре-



рецессивным типом наследования [15]. АФ обусловлена мутациями в гене фратаксина (*FXN*) и в большинстве случаев связана с экспансией GAA-тринуклеотидных повторов в первом интроне гена, что приводит к нарушению митохондриального транспорта железа [16]. Чаще болезнь проявляется в возрасте 5–25 лет, ведущим симптомом является смешанная (мозжечковая и сенситивная) атаксия. Клиническое течение варьируемо, но, как правило, спустя 10–15 лет после дебюта заболевания утрачивается способность ходить, стоять, сидеть без поддержки. Первыми гибнут нейроны спинальных ганглиев, затем развивается вторичная дегенерация спиноцеребеллярных и пирамидных путей, а также задних канатиков спинного мозга. В связи с этим клиническая картина АФ характеризуется прогрессирующей статико-локомоторной атаксией, потерей проприоцептивной и вибрационной чувствительности, арефлексией, глазодвигательными нарушениями в сочетании с пирамидными симптомами [17]. Возможно также поражение других проводящих путей (например, слухового, зрительного и др.). С течением заболевания, как правило, развиваются экстраневральные нарушения: гипертрофическая кардиомиопатия, сахарный диабет, сколиоз, эквинуварусные деформации стоп. При МРТ головного мозга атрофия мозжечка выявляется лишь на поздних стадиях, однако отмечается умеренная атрофия ствола головного мозга и спинного мозга.

Нами было обследовано более 40 пациентов с АФ, при этом клиническая картина заболевания была представлена широким спектром фенотипов: «классический», АФ с сохранными сухожильными рефлексам, фенотип спастической атаксии, атипичный «мягкий» вариант АФ, вариант LOFA (поздний дебют АФ) и вариант VLOFA (очень поздний дебют АФ) [15, 17–19]. Известно, что клиническая картина заболевания во многом определяется величиной экспансии GAA-повторов, однако многие проявления (в т.ч. экстраневральные) нельзя полностью объяснить этим фактором, поэтому в настоящее время крайне перспективным является изучение эпигенетических механизмов формирования фенотипа при АФ.

Молекулярно-генетическая диагностика остальных форм АР-СЦА крайне затруднена из-за значительной генетической гетерогенности группы и схожести клинических проявлений заболеваний. До настоящего времени ДНК-диагностика АР-СЦА состояла в последовательном анализе генов, выбранных на основании клинической картины и параклинических обследований, методом сэнгеровского секвенирования. Такой подход занимает длительное время и является достаточно трудоемким и дорогостоящим. В последние годы ситуация с молекулярным анализом сложных групп заболеваний драматически изменилась в связи с появлением новейших высокопроизводительных молекулярно-генетических технологий и, в первую очередь, секвенирования следующего поколения (*Next Generation Sequencing*, NGS). NGS позволяет за один рабочий цикл генерировать миллиарды нуклеотидных последовательностей, что обеспечивает параллельный анализ сотен выбранных генов или даже тотальное секвенирование всего генома. В последние годы появились единичные работы, обсуждающие применение секвенирования следующего поколения при атаксиях [20–22]. Ранее в российской популяции подобные исследования не проводились. Как уже отмечено выше, метод NGS-анализа успешно использован при диагностике СЦА 29 в семье с медленно прогрессирующей аутосомно-доминантной атаксией. В таблице указаны наши случаи идентификации с помощью технологии NGS редких форм АР-СЦА.

**Таблица.** Клинико-генетические характеристики пациентов с редкими формами АР-СЦА, выявленных методом NGS.

Диагноз	Ген	Тип наследования	Мутация	Клиническая картина
Болезнь Тея-Сакса	HEXA	АР	p.Gly269Ser p.Gln35Ter	Проксимальные амиотрофии, статико-локомоторная атаксия
АОА2	SETX	АР	p.N2010S	Статико-локомоторная атаксия, нистагм, дисметрия саккад, сенсомоторная полиневропатия

Болезнь Тея-Сакса с поздним началом — аутосомно-рецессивный GM2-ганглиозидоз, связанный с дефицитом бета-гексозаминидазы А (HEXA). Как правило, тяжелые проявления возникают уже в младенческом возрасте, однако встречаются и случаи с поздним дебютом в старшем детском и позднем возрасте, которые характеризуются мозжечковыми нарушениями, арефлексией, слабостью проксимальных групп мышц с их последующей атрофией и фасцикуляциями вследствие поражения переднего мотонейрона, а также психическими или поведенческими расстройствами. При ювенильной форме могут отмечаться спастичность, эпилептические приступы и деменция [23]. При МРТ головного мозга характерно выявление атрофии мозжечка. Мы наблюдали двух пациенток с поздним дебютом болезни Тея-Сакса, в клинической картине одним из ведущих синдромов была статико-локомоторная атаксия, причем в одном из случаев диагноз был установлен с использованием технологии NGS (таблица).

Еще одной формой АР-СЦА является атаксия с окуломоторной апраксией 1-го и 2-го типов (АОА1 и АОА2). АОА1 проявляется до 10-летнего возраста и характеризуется наличием атаксии ходьбы и конечностей, сенсомоторной полиневропатии, глазодвигательных нарушений, включая нистагм, нестабильности фиксации взора и окуломоторной апраксии различной степени выраженности, а также экстрапирамидных симптомов и легких когнитивных нарушений. К типичным находкам относятся атрофия мозжечка (особенно червя), гипоальбуминемия и гиперхолестеринемия. Болезнь развивается вследствие мутаций гена апраксина (*APTХ*), участвующем в репарации ДНК. АОА2 имеет сходный фенотип, но дебютирует позднее, в раннем подростковом возрасте, а при лабораторных исследованиях отмечается нормальное содержание альбумина и повышение альфа-фетопротейна в сыворотке. АОА2 занимает второе по частоте место в Европе среди аутосомно-рецессивных атаксий после атаксии Фридрейха. Она развивается вследствие мутаций в гене сенатаксина (*SETX*), ДНК/РНК-геликазы, участвующей в транскрипции и репарации ДНК и процессинге некодирующих РНК.

Описания наблюдений пациентов с АОА2 представлены в двух российских публикациях [24, 25]. В настоящее время под нашим наблюдением находится четверо пациентов с АОА2. Во всех случаях в клинической картине отмечалась выра-

женная статико-локомоторная атаксия, сенсомоторная полиневропатия (подтвержденная стимуляционной электронной миографией), грубые глазодвигательные нарушения (окуломоторная апраксия, спонтанный нистагм, офтальмопарез, нарушение медленных плавных и саккадических движений глазных яблок), кроме того, в трех случаях наблюдались экстрапирамидные нарушения (дистония, хореоатетоз, брадикинезия), когнитивные нарушения. Во всех случаях выявлялся повышенный уровень альфа-фетопротеина и нормальные значения альбумина в крови. У одного пациента методом таргетного панельного секвенирования была выявлена патогенная мутация p.N2010S в гене *SETX*, что при соответствующей клинической картине не требует поиска второй мутации.

В НЦН в последние годы наблюдаются пациенты и с другими редкими формами АР-СЦА — болезнью Ниманна–Пика типа С (лизосомная болезнь накопления, характеризующаяся, помимо атаксии, развитием вертикального супрануклеарного паралича взора, дистонии, прогрессирующей деменции) [26, 27], а также синдромом САНДО (синдром сенсорной атактической невропатии, дизартрии, офтальмопареза) — митохондриальным заболеванием с мутациями в гене *POLG* [28].

### Заключение

Несмотря на неуклонный рост числа открываемых генов атаксий, проведение генотипирования пациентов не всегда возможно в клинической практике. Некоторые наследственные атаксии принципиально поддаются лечению (например, болезнь Ниманна–Пика типа С, атаксия с дефицитом витамина Е), и его эффективность напрямую зависит от степени нейродегенеративных нарушений и возраста дебюта заболевания. Представляется целесообразным использование новейших молекулярно-генетических методов — в первую очередь, высокопроизводительного секвенирования следующего поколения (NGS) — для ДНК-диагностики различных видов наследственных атаксий и дальнейшего изучения их распространенности в российской популяции.

### Литература

- Иллариошкин С.Н., Руденская Г.Е., Иванова-Смоленская И.А. и др. Наследственные атаксии и параплегии. М.: МЕДпресс-информ, 2006.
- Ruano L., Melo C., Silva M.C., Coutinho P. The global epidemiology of hereditary ataxia and spastic paraplegia: a systematic review of prevalence studies. *Neuroepidemiology*. 2014; 42: 174-83.
- Harding A.E. Hereditary ataxias and related disorders. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1984.
- <http://neuromuscular.wustl.edu/ataxia/domatax.html>
- Orr H.T., Chung M., Banfi S. et al. Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nature Genet*. 1993; 4: 221-226.
- Иллариошкин С.Н., Иванова-Смоленская И.А., Лимборская С.А. и др. Пресимптомная ДНК-диагностика спиноцереbellарной атаксии 1-го типа. *Генетика*. 1997; 33: 693-698.
- Degardin A., Dobbelaere D., Vuillaume I. et al. Spinocerebellar ataxia: a rational approach to aetiological diagnosis. *Cerebellum*. 2012; 11: 289-299.
- Brusco A., Gellera C., Cagnoli C. et al. Molecular genetics of hereditary spinocerebellar ataxia: mutation analysis of spinocerebellar ataxia genes and CAG/CTG repeat expansion detection in 225 Italian families. *Arch. Neurol*. 2004; 61: 727-733.
- Иллариошкин С.Н., Сломинский Р.А., Овчинников И.В. et al. Spinocerebellar ataxia type 1 in Russia. *J. Neurol*. 1996; 243: 506-510.
- Платонов Ф.А., Иллариошкин С.Н., Кононова С.К. и др. Спиноцереbellарная атаксия первого типа в Якутии: распространенность и клинико-генетические сопоставления. *Медицинская генетика*. 2004; 5: 242-248.
- Проскокова Т.Н., Иллариошкин С.Н., Ключников С.А. и др. Быстро прогрессирующий «церебральный» вариант спиноцереbellарной атаксии типа 2. *Неврологический журнал*. 2003; 6: 30-33.
- Ключников С.А., Приходько Д.А., Абрамычева Н.Ю. и др. Спиноцереbellарная атаксия 17-го типа: первые наблюдения в российской популяции. В сб: Всероссийская научно-практическая конференция «Дегенеративные и сосудистые заболевания нервной системы», посвященная 180-летию преподавания неврологии в Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова (под ред. И.В. Литвиненко). СПб, 2016: 37-39.
- Fujigasaki H., Martin J.J., De Deyn P.P. et al. CAG repeat expansion in the TATA box-binding protein gene causes autosomal dominant cerebellar ataxia. *Brain*. 2001; 124: 1939-1947.
- Shadrina M.I., Shulskaya M.V., Klyushnikov S.A. et al. ITPR1 gene p.Val1553Met mutation in Russian family with mild Spinocerebellar ataxia. *Cerebellum Ataxias*. 2016; 3: 2.
- Ершова М.В. Митохондриальная недостаточность при болезни Фридрейха (клинико-генетические, биохимические и цитохимические исследования). Дис. ... канд. мед. наук. М., 2003.
- Ершова М.В., Иллариошкин С.Н. Молекулярные основы болезни Фридрейха. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2003; 2: 61-67.
- Иллариошкин С.Н., Ершова М.В. Атаксия Фридрейха. В кн.: Наследственные атаксии и параплегии (Иллариошкин С.Н., Руденская Г.Е., Иванова-Смоленская И.А. и др.) М.: МЕДпресс-информ, 2006: 49-113.
- Иллариошкин С.Н., Ершова М.В., Ключников С.А. и др. Спагическая атаксия как редкий клинический вариант болезни Фридрейха. *Неврологический журнал*. 2000; 5: 40-43.
- Иллариошкин С.Н., Ершова М.В., Багыева Г.Х. и др. Атипичные фенотипы болезни Фридрейха: ДНК-анализ и клинико-генетические сопоставления. *Медицинская генетика*. 2004; 1: 36-42.
- Németh A.H., Kwasniewska A.C., Lise S. et al. Next generation sequencing for molecular diagnosis of neurological disorders using ataxias as a model. *Brain*. 2013; 136 (Pt 10): 3106-3118.
- Mallaret M., Renaud M., Redin C. et al. Validation of a clinical practice-based algorithm for the diagnosis of autosomal recessive cerebellar ataxias based on NGS identified cases. *J. Neurol*. 2016; 263: 1314-1322.
- Hamza W., Ali Pacha L., Namadouche T. et al. Molecular and clinical study of a cohort of 110 Algerian patients with autosomal recessive ataxia. *BMC Med Genet*. 2015; 16: 36.
- Семенова О.В., Ключников С.А., Павлов Э.В. и др. Клинический случай болезни Тея-Сакса с поздним началом. *Нервные болезни*. 2016; 3: 57-60.
- Ключников С.А., Иллариошкин С.Н., Маркова Е.Д. и др. Семейный случай атаксии с окуломоторной апраксией: первое наблюдение в российской популяции. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2007; 2: 34-39.
- Руденская Г.Е., Куркина М.В., Захарова Е.Ю. Атаксии с окуломоторной апраксией: клинико-генетические характеристика и ДНК-диагностика. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2012; 10: 58.
- Ключников С.А. Алгоритм диагностики болезни Ниманна–Пика, тип С. *Нервные болезни*. 2012; 4: 8-12.
- Ключников С.А., Смирнов О.Р., Захарова Е.Ю. Клинический случай болезни Ниманна–Пика, тип С. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. 2013; 4: 43-48.
- Ключников С.А., Крылова Т.Д., Цыганкова П.Г. и др. Синдром SANDO — новая форма аутосомно-рецессивных атаксий. В сб.: *Болезнь Паркинсона и расстройства движений. Руководство для врачей по материалам III Национального конгресса* (под ред. С.Н. Иллариошкина, О.С. Левина). М.: Соверо пресс, 2014: 330-331.

## Наследственные спастические параплегии и генокопии: современные возможности диагностики

Г.Е. Руденская<sup>1</sup>, В.А. Кадникова<sup>1</sup>, Ф.А. Коновалов<sup>2</sup>, Е.Ю. Захарова<sup>1</sup>, А.В. Поляков<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Медико-генетический научный центр; <sup>2</sup> ООО «Геномед» (Москва)

Наследственные спастические параплегии (НСП) – одна из наиболее гетерогенных групп наследственных нервных болезней. Представления о многообразии НСП, давно известном по клинико-генеалогическим различиям, кардинально расширились с развитием молекулярной генетики. С 1986 г., когда был картирован ген одной из X-сцепленных форм, картирование и клонирование генов НСП шло возрастающими темпами. В международной номенклатуре формы с известными генными локусами получили обозначение “SPG” (Spastic Paraplegia Gene), с нумерацией по хронологии картирования. К 2006 г. число установленных локусов почти достигло 30, менее половины картированных генов были идентифицированы [3]; к 2008 г. было известно почти 50 локусов, но значительный разрыв между картированием и идентификацией генов сохранялся. Резкий скачок произошел с появлением и внедрением новых молекулярно-генетических методов – различных вариантов секвенирования нового поколения (NGS: Next Generation Sequencing). Только в 2014 г. в рамках международного исследования выделено 18 новых генетических форм [7], а в середине 2017 г. список замыкает SPG79! Число самостоятельных НСП больше: некоторые формы не вошли в общую нумерацию и имеют индивидуальные названия; в то же время, в перечне SPG есть пропуски: номерные обозначения были зарезервированы за формами, самостоятельность которых не подтвердилась [8]. В таблице представлено распределение SPG по типам наследования.

**Таблица.** Генетическая гетерогенность наследственных спастических параплегий (указано число форм).

Тип наследования	Гены картированы	Гены идентифицированы
Аутосомно-доминантный	24	17
Аутосомно-рецессивный	54	49
X-сцепленный рецессивный	5	3
Все типы суммарно	83	69

Лишь немногие картированные гены остаются неидентифицированными. Аутосомно-рецессивных форм гораздо больше, но доминантные встречаются в популяции значительно чаще.

К SPG примыкают несколько болезней с митохондриальным наследованием и фенотипом спастической параплегии, а также спастические атаксии и ряд других форм.

Некоторые SPG имеет аллельные фенотипы – как со спастическим паразезом (например, болезнь Пелицеуса–Мерцбахера связана с тем же геном *PLP1*, что SPG2), так и без спастичности (например, ген *SPG11* вызывает также одну из аутосомно-рецессивных моторно-сенсорных нейропатий, а ген *ATP13A2*, вызывающий рецессивный ювенильный паркинсонизм *PARK9*, оказался ответственным и за SPG78, описанную в 2017 г.).

Наряду с повсеместно распространенными формами есть описанные в единичных семьях, некоторые из них демонстрируют накопление в определенных популяциях.

Самой распространенной доминантной формой является SPG4 (ген *SPAST*), на втором месте по частоте SPG3 (ген *ATL1*). Обе формы относят к «неосложненным» (без сопутствующих симптомов); для SPG4 в целом характерно относительно позднее начало (не в каждом отдельном случае), для SPG3 – раннее. ДНК-диагностику обеих форм затрудняют большие размеры генов, отсутствие частых мутаций, а также наличие крупных делеций и дупликаций, не выявляемых секвенированием генов и требующих использования других методов ДНК-анализа.

В МГНЦ в течение ряда лет проводится клинико-молекулярная диагностика *SPG4* и *SPG3* [2, 5, 6]. Из 56 неродственных семей с клиническим диагнозом НСП в 19 (34%) найдены мутации *SPAST*: 18 разных мутаций (одна мутация встретилась в двух семьях), из них 12 – точечные мутации, 6 (33%) – крупные делеции/дупликации, выявленные методом МЛПА; 7 мутаций ранее не описаны; из 19 случаев 14 – семейные, 5 – изолированные. Мутации *ATL1* обнаружены в 8 из 20 (40%) тестированных семей: всего идентифицированы 6 разных мутаций (2 мутации найдены дважды), в их числе точечные мутации – 5, крупная делеция – 1 (17%); одна мутация ранее не описана; 6 случаев семейные, два изолированные. Доля SPG4 и SPG3 в наших выборках, где преобладали семейные случаи, в целом согласуется с данными литературы. Вклад SPG4 оказался не больше вклада SPG3, что может быть связано с размером и небезотборностью групп: в выборке тестированных на SPG3 преобладали случаи с ранним началом. Почти во всех семьях с SPG3 и SPG4 имела место типичная для обеих форм «неосложненная» НСП с медленным прогрессированием, в части родословных прослеживались неполная пенетрантность и субклинические случаи, при SPG4 – внутрисемейная вариабельность по возрасту начала и течению.

Подчеркнем, что значительный вклад крупных перестроек генов в структуру мутаций не позволяет полагаться в ДНК-диагностике SPG4 и SPG3 исключительно на метод NGS, поскольку он не выявляет мутации этого типа. Единственный случай SPG3, выявленный в семьях из Башкортостана, тоже обусловлен крупной дупликацией [1].

Отдельные случаи *других SPG* диагностированы в сотрудничестве с лабораторией молекулярной патологии ООО «Геномед», где проводился NGS-анализ больных, клинически обследованных в МГНЦ; в лаборатории ДНК-диагностики



МГНЦ данные NGS верифицировались секвенированием по Сэнгеру у пробандов и членов семей.

В семье с 4 больными в 4 поколениях и предварительно исключенными SPG3 и SPG4 диагностирована **SPG31**: относительно редкая форма (2–8% в структуре доминантных НСП), связанная с геном *REEP1* и клинически относящаяся к «неосложненным». У обследованных дочери 27 лет и отца найдена ранее не описанная мутация с.105+4A>G. В семье прослеживается характерная для SPG31 бимодальность возраста начала: у дочери и отца – раннее детство, у бабушки и прадеда – 6–7-е десятилетия жизни. SPG31 с началом в конце 3-го – начале 4-го десятилетий выявлена в русской и башкирской семьях из Башкортостана [1].

У больного 23 лет с неотягощенной родословной диагностирована *SPG11* – самая частая рецессивная НСП. В гене *SPG11* (другие названия: *KIAA1840*, спатаксин) найдены ранее описанная мутация p.Glu10261fs и новая p.Lys1577fs в компаунд-гетерозиготном состоянии. Эта форма, основной особенностью которой является сопутствующая агенезия/гипоплазия мозолистого тела, в 1990-х годах была описана как «японская», но после идентификации гена в 2007 г. выяснилась ее общность с наблюдениями в западных популяциях. В данном случае болезнь началась в 11 лет, кроме гипоплазии мозолистого тела сопутствующими симптомами были негрубая атаксия и легкое снижение интеллекта.

Относительно частой среди рецессивных форм является **SPG15** (синдром Къеллина), выявленная у подростка 13 лет. Характерный признак этой «осложненной» НСП, клинически описанной еще в 1959 г., – макулярная дегенерация; реже встречаются другие симптомы; возраст начала варьирует. У нашего больного трудности ходьбы появились в 11 лет, макулярной дегенерации не было, но вероятно ее развитие в будущем; кроме спастичности отмечены прогрессирующее снижение интеллекта, симптомы нейропатии. В ответственном за *SPG15* гене **ZFYVE26** обнаружена компаунд-гетерозиготность по новым мутациям с.2496\_2499delACCT (p.Pro832fs) и с.1706-1\_1709delCTCT (p.Ser569fs).

В настоящее время в лаборатории ДНК-диагностики МГНЦ внедрена таргетная NGS-панель «наследственные пареплегии».

Прогрессирующий спастический парепарез характерен для очень широкого круга болезней разной этиологии, в том числе наследственных: нейродегенеративной патологии, наследственных болезней обмена веществ (НБО), некоторых генетических синдромов. Далеко не все наследственные болезни с прогрессирующим спастическим парепарезом можно назвать генокопиями НСП, которые сами по себе являются группой генокопий. При многих наследственных болезнях, особенно ранних нейрометаболических, спастический парепарез не является ведущим, на первый план выходят отставание в психоречевом развитии, эпилепсия, другие неврологические и соматические симптомы, и проблема генокопий, а в практическом плане – дифференциальной диагностики с НСП не возникает. Вместе с тем, ряд наследственных болезней (особенно юношеского и взрослого возраста) с ведущим синдромом прогрессирующего спастического парепареза в той или иной мере имитирует НСП. При части из них в дифференциальной диагностике с НСП помогает МРТ головного/спинного мозга (поздняя болезнь Краббе, ряд поздних лейкоэнцефалопатий), но при других формах МРТ не изменена, как и в большинстве случаев НСП, или имеются негрубые неспецифичные изменения.

Приведем ряд наблюдений, в которых больные обратились в МГНЦ с подозрением на НСП, но при обследовании были диагностированы другие наследственные заболевания.

НСП была предварительным диагнозом в отдельных случаях **лейкоэнцефалопатии с вовлечением ствола и спинного мозга и высоким уровнем лактата в ЦНС**. Эта аутомно-рецессивная болезнь, связанная с геном митохондриальной аспартил-тРНК-синтетазы *DARS2*, оказалась относительно частой: с 2007 г., когда идентифицировали ген, в лаборатории наследственных болезней обмена (НБО) МГНЦ выявлено около 100 семей. Возраст начала варьирует от детского (чаще) до взрослого. Основные симптомы – спастический парепарез и атаксия в разном соотношении, часто преобладает спастичность. Характерное поражение белого вещества при МРТ позволило с высокой вероятностью предположить диагноз, а ДНК-диагностика, которую облегчает наличие двух частых мутаций *DARS2*, – подтвердить его.

Самой частой из лейкодистрофий является **X-сцепленная адренолейкодистрофия** – пероксисомная болезнь, обусловленная мутациями гена *ABCD1* и имеющая ряд клинических форм. В лаборатории НБО МГНЦ диагностировано более 100 не связанных между собой случаев (Куркина и др., 2016). НСП предполагалась у части больных с адреномиелонейропатией – поздней формой болезни. В этих случаях надпочечниковая недостаточность, чаще опережающая неврологические симптомы, не была ранее выявлена или считалась независимой, недоучитывались полинейропатия, ранняя алопеция, вегетативные и тазовые расстройства, в частности, нарушения половой функции, нехарактерные для НСП. МРТ при адреномиелонейропатии обычно не изменена (в отличие от церебральных форм) и не дает диагностической подсказки. В семейном анамнезе важен учет частого внутрисемейного сочетания разных форм болезни. Еще большее сходство с поздней НСП имеют проявления адренолейкодистрофии у женщин-гетерозигот: спастический парепарез без надпочечниковой недостаточности и других симптомов. Наличие больных женщин в родословной маскирует X-сцепленное наследование и усугубляет сходство с доминантной НСП, что имело место в двух наблюдавшихся нами семьях. Диагноз верифицируется исследованием ненасыщенных жирных кислот с очень длинной цепью (ОДЦЖК) в плазме и обнаружением мутаций в ответственном за болезнь гене *ABCD1*; для подтверждения диагноза у мужчин обычно достаточно исследования ОДЦЖК, но диагностика гетерозиготности биохимическими методами недостаточно надежна и требует молекулярно-генетического исследования. Дородовая диагностика также проводится молекулярно-генетическими методами.

Надпочечниковая недостаточность – составная часть редкого аутомно-рецессивного **синдрома Олгроува** (синдрома «трех А»: Алакрия, Ахалазия, Аддисонизм), связанного с геном *AAAS*. В акрониме нет указаний на разнообразные неврологические симптомы, присоединяющиеся спустя годы и даже десятилетия. Между тем, именно неврологические расстройства, в частности, спастический парепарез, определяют тяжесть болезни.

Больной 15 лет был направлен в наш центр с диагнозом НСП. Кроме спастического парепареза, начавшегося в 9 лет,

при осмотре были отмечены признаки нейропатии и нераспознанной ранее надпочечниковой недостаточности. Мы предположили адреномиелонейропатию; при срочном эндокринологическом обследовании тяжелая надпочечниковая недостаточность подтвердилась, начали заместительную терапию, но анализ ОДЦЖК исключил адренолейкодистрофию. Через 1,5 года, когда мы диагностировали синдром Олгроува у другой больной, обследование мальчика в лаборатории НБО было продолжено: в гене AAAS обнаружили частую «славянскую» мутацию p.Ser263Pro в гомозиготном состоянии. Ретроспективно выявили не замечавшуюся алакрию и нетяжелую ахалазию (запивал водой твердую пищу). Тот же генотип имела первая больная 47 лет, ее симптоматика включала спастический парез, но он не был ведущим в неврологической картине [4].

Редким наблюдением является семейный случай варианта атрофии зрительных нервов Лебера: «**атрофия зрительных нервов Лебера–рассеянный склероз**» (болезнь Хардинг). Больная 28 лет была направлена с подозрением на НСП либо рассеянный склероз. Кроме спастического пареза (с 26 лет) патологии в неврологическом статусе не было; при МРТ выявлены небольшие очаги в белом веществе. У 52-летней матери в 31 год развилась атрофия зрительных нервов с исходом в слепоту, с 36 лет присоединились спастический парез, недержание мочи; утратила ходьбу; диагностировали рассеянный склероз, МРТ не проводили. У бабушки 71 года с 54 лет частичная нисходящая атрофия зрительных нервов с умеренным снижением зрения. С учетом семейного анамнеза была предположена атрофия зрительных нервов Лебера, несмотря на сохранность зрения у пробанда. При анализе ДНК, проведенном в лаборатории НБО, у трех больных женщин и у здоровой дочери пробанда 4 лет найдена самая частая «леберовская» мутация митохондриальной ДНК m.11778G>A в состоянии гомоплазии (Иткис и др., 2011). По сведениям через 4 года, зрение у пробанда сохранно. В отличие от типичной атрофии зрительных нервов Лебера, чаще встречающейся у мужчин и проявляющейся исключительно патологией зрения, форма «атрофия зрительных нервов Лебера–рассеянный склероз» чаще наблюдается у женщин, преимущественно европеек с мутацией m.11778G>A.

Для митохондриальных энцефаломиопатий спастический парез нехарактерен, но есть наблюдения генокопий НСП с мутациями мтДНК. Например, в семье, где 5 больных имели картину НСП с началом в 30–50 лет, в гене *MT-ATP6* найдена гомоплазия по описанной ранее при синдроме Ли мутации m.9176T>C [9].

Выделенная в 2011 г. **нейродегенерация с накоплением железа в мозге 4-го типа** (ННЖМ-4, международный акроним: MPAN) – аутомно-рецессивная форма, связанная с геном C19orf12. Типично начало на 2-м десятилетии, пирамидные симптомы преобладают над экстрапирамидными (в отличие от более частой и давно известной ННЖМ-1, связанной с геном PANK2), а характерная МРТ-картина, обусловленная отложением железа в базальных ганглиях (но без типичного для ННЖМ-1 «глаза тигра»), может сформироваться отсроченно, как в представленном наблюдении. У больной 14 лет имел место изолированный спастический парез (с 12 лет) при нормальной МРТ, что позволило подтвердить предварительный диагноз НСП (без ДНК-диагностики). При повторном обращении в 19 лет картина была иной: МРТ в 16 лет выявила признаки ННЖМ без «глаза тигра», в 17–19 лет присоединились негрубая дистония, частичная атрофия зрительных нервов без снижения зрения, легкие когнитивные нарушения. В лаборатории НБО проведена ДНК-диагностика ряда ННЖМ. В гене C19orf12 найдена частая восточноевропейской мутации Gly69ArgfsX10 в гомозиготном состоянии, как и в нескольких других наших наблюдениях ННЖМ-4 [2].

Случай **болезни Герстмана–Штройслера**, редкого прионного заболевания, диагностирован совместно с лабораторией «Геномед». Больная 32 лет обратилась в МГНЦ самостоятельно, НСП предполагалась у ее умершего отца. С 27 лет у женщины нарастает спастический парез, имеется легкая атаксия, при МРТ – минимальная атрофия мозжечка, ранее исключен рассеянный склероз. У отца с 35 лет были трудности ходьбы, с 40 лет не ходил, развилась грубая дизартрия, интеллект не страдал, умер в 44 года. Болен также брат 37 лет: с 26 лет трудности ходьбы, в течение года почти не ходит; с 28 лет редкие эпилептические припадки, с 35 лет ремиссия; в статусе (по выписке): спастико-атактический синдром с преобладанием атаксии, дизартрия, снижение память на текущие события, депрессия при сохранном интеллекте. Картина болезни отца и брата не соответствовала диагнозу НСП. Исключив спиноцеребеллярные атаксии типов 1–3 (динамические мутации не выявляются методами NGS), мы рекомендовали панельное NGS, обнаружившее в гене прионного белка *PRNP* гетерозиготность по мутации c.305C>T (p.Pro102Leu), частой при болезни Герстмана–Штройслера. В лаборатории ДНК-диагностики МГНЦ мутация была подтверждена у больной и найдена у брата. Хотя болезнь Герстмана–Штройслера течет не столь быстро и неблагоприятно, как болезнь Крейтцфельдта–Якоба и летальная семейная бессонница, достаточно длительное течение без деменции в этой семье является атипичным. При диффузионно-взвешенной МРТ, проведенной больной в Научном центре неврологии, не найдено изменений, типичных для болезни Крейтцфельдта–Якоба, но встречающихся и при болезни Герстмана–Штройслера.

**Глазо-зубо-пальцевой синдром** (ГЗПС; oculodentodigital dysplasia: ODDD) – аутомно-доминантная болезнь, обусловленная мутациями гена коннексина 43 *GJA1*. Типичная картина включает полную ульнарную синдактилию кистей (IV–V или III–V пальцев) нередко в сочетании с синдактилией стоп, аномалии глаз (микрофтальм, микрокорнея и др.), зубов, волос, особенности лица. Кроме того, у многих больных в разном возрасте присоединяются прогрессирующий спастический парез, расстройства тазовых функций, атаксия, очаговое поражение белого вещества при МРТ. Неврологические нарушения выходят на первый план в клинической картине. ГЗПС с неврологическими симптомами, особенно у взрослых, не всегда распознается и расценивается как «чисто» неврологическая патология; экстракраневральные симптомы не замечают (синдактилия чаще скорректирована в детстве, другие аномалии бывают не столь наглядны) либо считают независимыми. По данным литературы, неврологические расстройства наблюдаются в трети случаев, однако они имели место во всех наших наблюдениях: у 5 больных женщин 10–59 лет из 4 семей. Мать 59 лет и дочь 37 лет с полным «набором» экстракраневральных симптомов были направлены в с диагнозом НСП, две неродственные больные – с диагнозами «атаксия»



и «лейкодистрофия»; у всех четырех ведущим неврологическим симптомом был спастический парапарез, возраст начала которого варьировал от 8 до 40 лет. Лишь у одной больной ГЗПС был клинически диагностирован ранее; парапарез у нее был субклиническим, но, как и у остальных больных, имелись расстройства тазовых функций (в отличие от НСП, эти расстройства не отсрочены от спастичности и даже могут их опережать). У 4 больных при МРТ выявлена непрогрессирующая лейкоэнцефалопатия; у одной больной МРТ не проводили, при КТ обнаружены кальцинаты – нередкий признак ГЗПС. Все случаи подтверждены в лаборатории ДНК-диагностики МГНЦ: в экзоне 2 гена *GJA1* найдены три не описанные ранее мутации в гетерозиготном состоянии: с.400\_402delAAG (в двух семьях), с.461С>Т (р.Thr154Ple) и с.94Т>G (р.Phe32Val). В трех несемейных случаях возникновение мутаций *de novo* доказано анализом ДНК родителей; в семье с больными матерью и дочерью мутация у матери, чьи родители здоровы, тоже, очевидно, возникла *de novo*. Это первые российские наблюдения ГЗПС, подтвержденные анализом ДНК (Руденская и др., 2017).

**Фенокопии** НСП (ненаследственные болезни с ведущим синдромом прогрессирующего спастического парапареза) очень многообразны – от частых (спондилогенная миелопатия, опухоли спинного мозга, рассеянный склероз и т.п.) до экзотических (нейролатеризм, тропический спастический парапарез и ряд других). В практике медико-генетического консультирования мы чаще сталкиваемся с недооценкой генетической этиологии спастического парапареза (как и других болезней ЦНС), но бывает обратная ситуация. Примером является наше недавнее наблюдение. Больной 32 лет был направлен с диагнозом НСП для ДНК-верификации. Семейной отягощенности НСП нет. Страдает циррозом печени, в 30 лет проведено портокавальное шунтирование, вскоре после этого развился спастический парапарез, который быстро прогрессировал: дома ходит с трудом, опираясь о стену, на приеме – в кресле-коляске. Императивные позывы к мочеиспусканию были вначале и прекратились. МРТ головного и спинного мозга без диагностически значимых изменений. Бывают приступообразные проявления печеночной энцефалопатии (возбуждение, неадекватность), вне этого, со слов матери, интеллект и поведение сохранены. При осмотре отмечена желтушность склер и кожи; в ногах резкий гипертонус (невозможно пассивное сгибание), гиперрефлексия, сгибательные и разгибательные стопные знаки. Анамнез и симптоматика позволили нам диагностировать **печеночную миелопатию** – более редкое, чем печеночная энцефалопатия, но неоднократно описанное осложнение цирроза, обычно связанное с портокавальным шунтированием [6]. Быстрое прогрессирование парапареза (атипичное для НСП) без значительных тазовых нарушений согласуется с этим диагнозом.

Таким образом, дифференциальная диагностика в широком круге НСП, их гено- и фенокопий может быть сложной. NGS-исследования высоко информативны, но имеют существенные ограничения и трудности трактовки результатов, с их внедрением роль врача в диагностике наследственных болезней не только не уменьшилась, но возросла, требуя постоянного обновления знаний. Большую помощь на всех этапах диагностики оказывают специализированные генетические и общемедицинские интернет-ресурсы.

### Литература

1. Ахметгалеева А.Ф. Молекулярно-генетическое исследование спастических параплегий в Республике Башкортостан. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Уфа, 2017.
2. Захарова Е.Ю., Руденская Г.Е. Новая форма наследственной нейродегенерации с накоплением железа в мозге: клинические и молекулярно-генетические характеристики. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2014; 1: 4–12.
3. Иллариошкин С.Н., Руденская Г.Е. Иванова-Смоленская И.А. и др. Наследственные атаксии и параплегии. М.: МЕДпресс-информ, 2006.
4. Руденская Г.Е., Захарова Е.Ю., Карева М.А. Неврологические проявления синдрома Олгрова (синдром «трех А»). Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2013; 4: 70–74.
5. Руденская Г.Е., Сермягина И.Г., Иллариошкин С.Н. и др. Наследственная спастическая параплегия, тип 4 (SPG4): клинические и молекулярно-генетические характеристики. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2010; 6: 12–19.
6. Nardone R., Höller Y., Storti M. et al. Spinal cord involvement in patients with cirrhosis. World J. Gastroenterol. 2014; 20: 2578–2585.
7. Novarino G., Fenstermaker A., Zaki M. et al. Exome sequencing links corticospinal motor neuron disease to common neurodegenerative disorders. Science. 2014; 343: 506–511.
8. OMIM (On-line Mendelian Inheritance in Man). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>
9. Verny C., Guegen N., Desquiret V. et al. Hereditary spastic paraplegia-like disorder due to a mitochondrial ATP6 gene point mutation. Mitochondrion. 2011; 11: 70–75.

## Миофасциальные болевые синдромы: ботулинотерапия как интеграция последних достижений науки и практики

З.Н. Коновалова<sup>1</sup>, О.Р. Орлова<sup>2</sup>, Л.Р. Мингазова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Центр междисциплинарной стоматологии и неврологии;

<sup>2</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Москва)

Мышечно-связочные нарушения относятся к числу наиболее распространенных патологических состояний и часто остаются нераспознанными, что связано как с объективными диагностическими трудностями, так и с малой информированностью медицинских специалистов. Мышечно-связочные нарушения являются одной из основных причин возникновения болей в области плеча, шеи, поясницы, что делает эту проблему актуальной для врачей различных специальностей. Существует высокий уровень костно-мышечной боли среди взрослого населения (26%), престарелых (39%) и работающего населения (86%). Наиболее ярко патологию мышечно-связочного аппарата отражает миофасциальный болевой синдром (МФБС), характеризующийся развитием мышечной дисфункции и формированием локальных болезненных уплотнений в пораженных мышцах. Миофасциальный болевой синдром (МФБС) является частым симптомом, наиболее распространенным у пациентов, которые сообщают о спинальной боли, о боли в верхних и нижних конечностях. Распространенность МФБС у людей, страдающих костно-мышечной болью, варьирует от 30% до 85%. Действительно, 48,9% медицинских работников лечат более 4 пациентов с МФБС в неделю и оценивают распространенность активных миофасциальных триггерных точек как 46,1% от общей численности населения и 52,8% среди их пациентов. О более высоком уровне сообщают клинические специалисты, которые участвуют в конференциях по боли (55,4% и 63,4%, соответственно).

Несмотря на существование большого числа методов лечения пациентов с болевым синдромом, в большинстве случаев с целью его купирования применяют фармакологические методы в сочетании с физиотерапией. Одним из принципиально новых направлений среди фармакологических методов является использование препаратов ботулинического токсина А (БТА), показавших свою эффективность в качестве антиноцицепторов при лечении болевых синдромов.

МФБС, будучи проявлением миогенной боли, включает в себя формирование суставной, дискогенной боли и может существовать самостоятельно [1]. МФБС, как уже было отмечено, является самым распространенным заболеванием мышечной системы, и его изучению в разные годы было посвящено множество работ, в том числе отечественных авторов [1–5]. Одной из наиболее фундаментальных работ является монография: Travell & Simons' Myofascial Pain and Dysfunction: The Trigger Point Manual. После появления русского издания (Дж. Г. Тревелл, Д.Г. Симонс. «Миофасциальные боли», 1989) академик А.М. Вейн в предисловии писал: «Можно лишь удивляться тому, что врачи, постоянно имеющие дело с патологией висцеральных органов, нервной системы, костных образований и кожи, так непростительно мало внимания обращали на патологию мышц». Актуальность проблемы МФБС связана не только с трудностью диагностики и полиэтиологичными факторами возникновения, но и с не всегда эффективным лечением, что требует поиска новых способов терапии. Кроме того, МФБС является классической междисциплинарной проблемой, и разнообразие клинических проявлений приводит этих пациентов на прием как к неврологу, так и к терапевту, ортопеду, стоматологу, кардиологу и даже психиатру.

Почему МФБС является столь частой патологией? Объяснений этому феномену несколько. Все мышцы организма работают согласованно, и если одна из мышц перестает справляться со своей работой в результате определенных проблем, возникших в ней (травма, иммобилизация, нарушение статики, нарушение окклюзии и т.д.), тут же на себя берут нагрузку другие мышцы, и в результате возникшей перегрузки в них может возникнуть мышечный гипертонус (МГ), который составляет основу МФБС – *триггерный пункт* (ТП) [1]. Сам термин «миофасциальный» возник из понимания, что и мышцы, и фасции влияют на симптом, то есть вносят свой вклад в его развитие. АТП – это участок уплотнения мышцы с локальной и отраженной болезненностью, может сопровождаться симптомом «прыжка» (при надавливании на ТП пациент вздрагивает всем телом, подпрыгивает). ТП могут быть как активными (АТП), так и латентными (ЛТП). АТП – участок уплотнения мышцы со спонтанной и отраженной болезненностью, при пальпации может возникнуть симптом «прыжка». ЛТП – участок уплотнения мышцы, характеризуется отсутствием «спонтанной» боли и симптома «прыжка» при пальпации. Надо отметить, что АТП в процессе лечения (массаж, физиотерапия, медикаментозная терапия), а также и самостоятельно под воздействием тепла, благоприятной психологической обстановки, во время отдыха могут переходить из активной стадии в латентную, и, наоборот, под воздействием холода, нервного перенапряжения, физической нагрузки, длительного изометрического напряжения – из латентного состояния в активную стадию.

Диагностируется миофасциальная боль путем пальпации мышц с целью обнаружения ТП. Для этого необходима правильная техника пальпации (рис. 1). Есть метод глубокой пальпации, когда врач пальпирует кончиками пальцев поперек мышечных волокон (рис. 1А), и метод клещевой пальпации (рис. 1Б), когда врач захватывает брюшко мышцы большим и остальными пальцами руки и как бы прокатывает мышцу между ними.

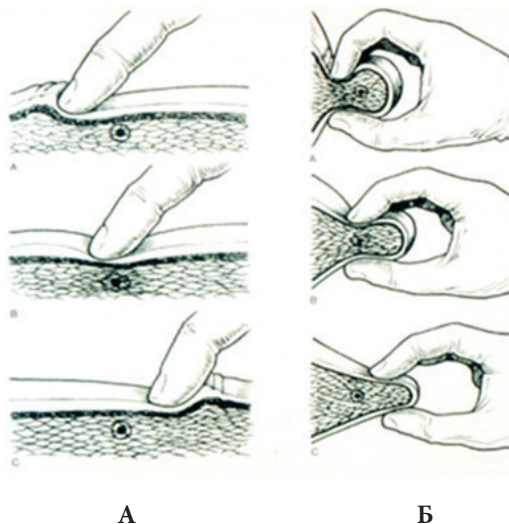


Рисунок 1. Схематичное изображение нахождения ТП в мышце (Трэвелл Д.Г., Симонс Д.Г., 2005).

Согласно определению Международной ассоциации по изучению боли (IASP, 1994) МФБС – это хроническая боль, возникающая от одного или нескольких триггерных пунктов (ТП) одной или нескольких мышц позвоночника. Данное определение уже не является точным, так как ТП могут возникнуть абсолютно в любой мышце и, кроме боли, пациент может испытывать много других симптомов. Более точно МФБС можно определить как симптомокомплекс, состоящий из чувствительных (боль, ощущение онемения или жжения, парестезии, дизестезии, гиперестезии), двигательных (уменьшение объема движений, тугоподвижность суставов) и вегетативных (нарушенное потоотделение, персистирующее слезотечение, ринорея, шум в ушах, нарушение равновесия) симптомов, вызываемых ТП. Именно такое разнообразие клинических проявлений МФБС и определяет его «междисциплинарность».

МФБС является наиболее частой причиной головной и лицевой боли, боли в спине, в плече, а также сопровождается мышечной дистонией и постинсультной спастичностью. Учитывая такой обширный перечень возможных проявлений заболевания, становится ясно, почему нередко и диагностика, и терапия могут вызывать затруднения.

МФБС, вызванный ТП, является доминирующей причиной возникновения боли в любой части туловища и порой служит «маской» широкого спектра заболеваний, по поводу которых пациенты обращаются к врачам разных специальностей. Особенности клинического течения болевого синдрома пациентов с МФБС могут напоминать стенокардию, невралгию тройничного нерва, мигрень, головные боли напряжения, острую ушную боль, «теннисный локоть», плечелопаточный периартрит и т.д., что нередко приводит к диагностическим ошибкам и длительному назначению неадекватной терапии, способствуя развитию личностных особенностей и болевого поведения, характерных для пациентов с хронической болью [6].

#### Этиология и патогенез МФБС

Формирование МФБС – многофакторный процесс, предполагающий взаимодействие различных механизмов, которые приводят к периферической сенситизации болевых рецепторов [7], что является определяющим фактором в формировании МФБС. Травматизацию мышц, приводящую к формированию МФБС, связывают, прежде всего, с мышечной перегрузкой, вызванной постоянными повторяющимися мышечными сокращениями (спазмом мышц). При непрерывном длительном сокращении мышцы страдает капиллярный внутримышечный кровоток, снижается уровень кислорода и глюкозы, нарушается метаболизм внутри клеток, что приводит к их повреждению [8]. Считается, что именно при работе минимальной интенсивности в течение длительного времени происходит пространственная перегруппировка сократительного субстрата, а сильные, но кратковременные нагрузки в мышце не ведут к перегруппировке ткани, так как наступающее утомление препятствует этим изменениям. Синдром клеточно-тканевой гипоксии, его развитие и стадийность также подробно описаны в работах А.А. Лиева и Г.А. Иваничева [9]. Таким образом, основной пусковой фактор развития МФБС – изменение функционального состояния мышечной ткани вследствие ее микротравматизации. А приводит к этой микротравматизации перерастяжение и длительное перенапряжение мышц вследствие работы мышц (в результате спортивной травмы, неудачного броска мяча, поворота, сдавливания мышцы лямками тяжелого рюкзака или сумки, ношения тяжелого пальто или шубы). Также играет роль и позное перенапряжение вследствие структурной аномалии скелета (деформация стопы, плоскостопие, длинная 2-ая плюсневая кость, разница в длине ног, торсия таза, сколиоз, кифоз, короткие плечи). В этом случае причинно-следственные связи возникновения МФБС можно представить следующим образом: деформация стопы – «укорочение» конечности – перекос таза – компенсаторный сколиоз – асимметрия надплечий – наклон головы, что в дальнейшем может привести даже к эстетическим изменениям (асимметрия лица, нарушение овала лица) – в последующем наступает декомпенсация и развивается МФБС. Еще одной из причин возникновения мышечной боли с формированием МФБС, особенно в шейном и грудном отделах, является длительное время нахождения в нефизиологическом положении (неправильная поза при работе за столом, длительное пребывание на корточках, прижимание телефона ухом к плечу и др.). И, к сожалению, проблема неправильной позы за столом идет с самого раннего детства и сопровождает нас всю жизнь, особенно это очевидно в неправильной организации рабочего места врача, ведущего многочасовой амбулаторный прием.



Также свою роль в развитие заболевания вносят структурные изменения хрящевой ткани (патология межпозвоночных дисков, дегенеративно-дистрофические изменения суставов) и психологические факторы, обуславливающие сложные компоненты психосоциальной дисфункции [10].

Таким образом, для возникновения и развития МФБС обязательными условиями возникновения являются наличие как предрасполагающих и провоцирующих (психогенные, травматические, ортопедические, одонтогенные), так и поддерживающих (гиподинамия, неправильный стереотип движений, позное перенапряжение, психовегетативный синдром) факторов. Доказано, что патогенетически МФБС является не локальным, а генерализованным феноменом, затрагивающим несколько уровней нервной системы (сегментарные и супрасегментарные), а предложенный метод воздействия – инъекции ботулотоксина типа А (препарат Диспорт) – воздействует на функциональное состояние разных уровней патогенеза МФБС [11].

### Диагностика

Диагностика МФБС требует от врача комплексного подхода и оценки общего состояния пациента. Она включает полноценный клинический осмотр: неврологический, общесоматический, ортопедический. При этом учитываются психологические и поведенческие нарушения. Диагноз МФБС ставится на основе клинического обследования.

**Критерии диагноза [12] даются ниже.**

А. «Большие» критерии (необходимо наличие всех 5):

- 1) пальпируемый «тугой тяж» в мышце;
- 2) четко определяемая болезненность узла при пальпации тяжа;
- 3) жалобы на локальную и региональную боль;
- 4) болезненное ограничение объема подвижности;
- 5) характерная зона отраженных болей.

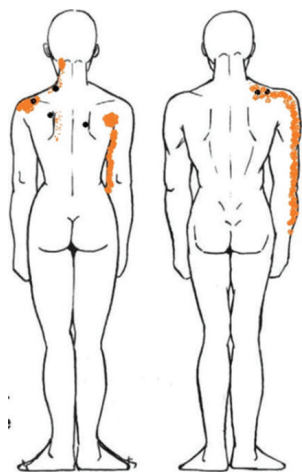
Б. «Малые» критерии (необходимо наличие 1 из 3):

- 1) воспроизводимость боли или чувствительных нарушений при стимуляции ТП;
- 2) локальное вздрагивание («симптом прыжка») при пальпации или инъекции в ТП;
- 3) уменьшение боли при растяжении или инъекции в мышцы.

Для МФБС характерно, что боль обычно носит тупой и продолжительный характер, часто ощущается в глубине тканей, а ее интенсивность варьирует от дискомфорта до жестоких и мучительных болей, усиливающаяся ночью.

Необходима тщательная пальпация мышц, в которых возможно образование ТП. Локализация их, как правило, не совпадает с зонами боли, на которые указывает пациент. Пациенты обычно жалуются на зону отраженной боли, поэтому необходимо знание мышц, способных отражать боль в различные зоны организма, например, боль в области темени может быть отраженной от активного ТП, расположенного в грудино-ключично-сосцевидной или ременной мышцах.

Учитывая, что боль – это субъективный феномен, плохо поддающийся объективизации, мы используем в работе с пациентами для оценки МФБС и эффективности лечения «карту боли» (рис. 2) и ВАШ (визуально-аналоговую шкалу). На «карте боли» представлена схема тела человека, на которой врач после тщательного опроса и осмотра пациента отмечает локализацию ТП (на рис. 2 – черные точки) и зоны иррадиации боли (на рис. 2 отмечены красным цветом). ВАШ представляет собой прямую линию, начало которой (0) соответствует отсутствию боли – «боли нет». Конечная точка на шкале (10) отражает мучительную невыносимую боль – «нестерпимая боль». Пациенту предлагается оценить свою боль в баллах, соответствующую интенсивности испытываемых им в данный момент болевых ощущений. После лечения, для оценки его эффективности, «карта боли» и ВАШ заполняются повторно.



**Рисунок 2.** Карта боли.

Дополнительные методы исследования (электромиография, альгометрия, термография, ультразвуковые методики) играют вспомогательную роль в диагностике МФБС, поскольку обладают низкой чувствительностью и специфичностью [10].

### Лечение МФБС

В лечении МФБС всегда применяется комплексный подход, который включает воздействие на все звенья патогенеза: создание покоя пораженной мышце; назначение миорелаксантов, НПВП, антидепрессантов; локальные инъекции анестетиков в область ТП; аппликации гелей и мазей; иглорефлексотерапия; упражнения на растяжение мышц в совокупности с мягкими миорелаксическими техниками; расслабляющий массаж; лечение основного заболевания (при вторичном МФБС); инъекции ботулотоксина типа А (БТА).

Одним из принципиально новых направлений среди терапевтических методов является использование препаратов БТА [13, 14].

Вряд ли какой-либо другой лекарственный препарат имеет подобную историю успешного применения в различных областях медицины и потенциально высокие возможности для расширения показаний к его использованию в будущем. Изначально в качестве локального миорелаксанта он использовался для лечения косоглазия, блефароспазма и гемифациального спазма, затем начал применяться при лечении фокальной дистонии и спастичности, в медицинской косметологии – для коррекции морщин, потливости, и при очень многих других показаниях. Но благодаря своему уникальному механизму действия, которое на сегодняшний день не смогли повторить

ни в одном из фармацевтических препаратов, включающему миорелаксирующее и антиноцицептивное действие, сфера применения БТА расширилась еще больше. Инъекции БТА нашли свое применение при различных болевых синдромах.

Обезболивающий эффект препаратов БТА впервые был отмечен при лечении дистонии и других спастических расстройств, которые сопровождалась болью [15]. Кроме того, их успешно применяют для лечения мигрени [16–20]. Между тем, боль стала отдельным объектом изучения воздействия БТА. В последние годы проведено много исследований, в результате которых получены данные, свидетельствующие о высоком анальгетическом потенциале ботулинотерапии. Опубликованы результаты применения БТА при МФБС, миогенной дисфункции височно-нижнечелюстного сустава, хронических болях в крупных суставах, тригеминальной и постгерпетической невралгиях, хронической лицевой боли при гиперактивности жевательных мышц, головных болях [11, 21–].

Задачей многих исследований был поиск ответа на вопрос, почему ботулинический токсин приносит облегчение при болевом синдроме? Терапевтическая активность БТА обусловлена, прежде всего, его способностью вызывать обратимую денервацию и локальное расслабление мышцы-мишени. Вызывая расслабление мышц, БТА блокирует активацию периферических ноцицепторов и, соответственно, патологическую импульсацию по болевым волокнам, что приводит к снижению гипервозбудимости периферических ноцицептивных нейронов в тригеминальных или спинальных ганглиях и, таким образом, уменьшает периферическую сенситизацию [25, 26].

Хотя на сегодняшний день уже не подлежит сомнению, что БТА обладает антиноцицептивным действием, вероятно, отсутствие эффекта или недостаточный эффект при некоторых болевых синдромах связан с неточной диагностикой (необходимы четкие критерии отбора пациентов для проводимых инъекций), выбором неоптимальной дозы препарата и места инъекции. При МФБС могут страдать несколько мышц, а зоны отраженных болей – перекрывать друг друга. В результате наблюдается комбинация различных болевых зон, вызванных ТП, расположенными в нескольких мышцах. Поэтому для точной локализации места инъекции необходимо применение ЭМГ-контроля инъекций, который на сегодняшний день является «золотым стандартом» проведения ботулинотерапии. В настоящее время в практической ботулинотерапии признано, что низкий результат после инъекций БТА в большинстве случаев связан с неточным выбором и определением локализации мышц-мишеней [27].

Портативный аппарат для ЭМГ-контроля комплектуется специальными иглами-электродами для введения БТА и регистрации мышечной активности. При попадании иглы-электрода в ТП мы слышим характерный звуковой сигнал, подобный «треску»; таким образом врач может верифицировать место инъекции. Инструментальный контроль инъекций с помощью УЗИ желателен при глубоком расположении мышц в зонах риска (близость магистральных сосудов, плевры).

Почему все-таки при наличии такого разнообразия методов лечения МФБС мы отдаем предпочтение ботулинотерапии? У этого метода есть ряд существенных преимуществ:

1) Таргетное воздействие на патогенез боли – блокирование гиперактивных рецепторов мышечных веретен, запускающих механизм периферической сенситизации.

2) Локальное воздействие. В обычной практике лечения МФБС мы чаще воздействуем на всю мышцу, так как она вовлекается в процесс, но воздействие на точку – это наиболее короткий путь к лечению мышечного гипертонуса, ликвидации отраженной боли, а, следовательно, и более эффективное использование лечебного ресурса. В России подобная работа была впервые проведена в Казани Ф.И. Девликамовой [28], которой показана достоверная эффективность введения ботулинического нейротропина типа А (Диспорт) непосредственно в триггерный пункт мышцы, что позволяет повлиять на источник боли и избежать нежелательной мышечной слабости. В работе Л.Р. Мингазовой эффективность ботулинического нейротропина типа А (Диспорт) была доказана при введении в жевательные мышцы у пациентов с МФБСЛ [11].

3) Относительная простота процедуры и экономия времени. Многие пациенты не могут себе позволить ходить неделями, а то и месяцами на массаж, физиотерапию, иглотерапию, им необходим быстрый эффект.

4) Контролируемый дозозависимый эффект. При недостаточности воздействия можно на любом этапе дополнить введение препарата в уже инъецированные точки или ввести препарат в другие точки.

5) Невозможность приема пероральных препаратов. У кого-то из пациентов есть противопоказания к приему медикаментов либо предубеждение против их длительного приема.

6) Продолжительность действия. Эффект от применения БТА длится 3–6 месяцев, а это – достаточный период для необходимых реабилитационных мероприятий и ортопедической коррекции. «Безболевого» периода такой длительности важен для изменения двигательного стереотипа, изменения осанки.

7) Практически отсутствуют абсолютные противопоказания.

### Заключение

Наш опыт применения инъекций БТА показывает его эффективность в использовании для лечения МФБС. Клинический эффект отмечается с 7-го по 14-й день (до 21 дня) и остается стабильным в течение 3–6 месяцев. Препарат оказывает миорелаксирующее и обезболивающее действие. Процедура может проводиться в амбулаторных условиях. Подробное описание техники проводимых инъекций можно найти в Медицинской технологии по Диспорту и в других публикациях последнего времени [29].

## Литература

1. Иваничев Г.А. Клинические болевые мышечные синдромы. Казанский медицинский журнал. 2011; 2: 92.
2. Иваничев Г.А. Мануальная терапия: руководство, атлас. Казань, 1997.
3. Попелянский Я.Ю., Заславский Е. С., Веселовский В. П. О медико-социальной значимости, этиологии, патогенезе и диагностике внесуставных поражений мягких тканей конечностей и спины. Вопросы ревматологии. 1976; 36 38-43.
4. Скоромец А. А., Горохов В. Е. и др. Дифференциальная диагностика миофасциальных болевых синдромов в области головы и плечевого пояса. Реабилитация больных с заболеваниями периферической нервной системы. Кисловодск, 1990.
5. Хабиров Ф.А., Хабиров Р.А. Мышечная боль. Казань, 1995.
6. Степанченко А.В., Гречко В.Е., Неймагов Э.М. Краниальные нервы в норме и патологии. М.: МНПШ, 2001.
7. Shah J.P., Danoff J.V., Desai M.J. et al. Biochemicals associated with pain and inflammation are elevated in sites near to and remote from active myofascial trigger points. Arch. Phys. Med. Rehabil. 2008; 89: 16-23.
8. Gerwin R. Myofascial pain syndrome: here we are, where must we go? J. Musculoskeletal Pain. 2010; 18: 329-347.
9. Лиев А.А., Иваничев Г.А. Патогенез первичного и вторичного фасциального триггерного пункта. Вестник Евроазиатской академии медицинских наук. 1994; 2-3: 38-42.
10. Воробьева О.В. Миофасциальные болевые синдромы, локализованные в области спины. Лечащий врач. 2013; 9: 28-31.
11. Мингазова Л.Р. Клинико-физиологический анализ и лечение миофасциального болевого синдрома лица. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2005.
12. Трэвелл Д.Г., Симонс Д.Г. Миофасциальные боли и дисфункции, 2005: Т.1.
13. Орлова О.Р., Яхно Н.Н. Применение Ботокса (токсина ботулизма типа А) в клинической практике, М.: Каталог, 2001.
14. Brin M.F., Jankovic J., Hallett M. (eds). Scientific and Therapeutic Aspects of Botulinum Toxin. Lippincott, Williams&Wilkins, 2002.
15. Costa J., Espirito-Santo C., Borges A. et al. Botulinum toxin type A therapy for cervical dystonia. Cochrane Database of Systematic Reviews, no. 1, Article ID CD003633, 2005.
16. Brin M.F., Swowe D.M., o'Brian C. et al. Botox for migraine: doubleblind, placebo-controlled, region-specific evaluation. Cephalalgia. 2000; 20: 421-422.
17. Mathew N.T., Frishberg B.M., Gawel M. et al. Botulinum toxin type A (BOTOX) for the prophylactic treatment of chronic daily headache: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Headache. 2005; 45: 293-307.
18. Farinelli I., Coloprisco G., De Filippis S., Martelletti P. Long-term benefits of botulinum toxin type A (BOTOX) in chronic daily headache: a five-year long experience. J. Headache Pain. 2006; 7: 407-412.
19. Porta M., Camerlingo M. Headache and botulinum toxin. J. Headache Pain. 2005; 6: 325-327.
20. Silberstein S., Mathew N., Saper J., Jenkins S. Botulinum toxin type A as a migraine preventive treatment. For the BOTOX Migraine Clinical Research Group. Headache. 2000; 40: 445-450.
21. Мозолевский Ю.В. Ботокс возвращает на корт. Журнал «Теннис и гольф». 2000; 3(6): 5.
22. José M., Ta-Shen K., Fenollosa P. et al. Botulinum Toxin for the Treatment of Myofascial Pain Syndromes Involving the Neck and Back: A Review from a Clinical Perspective. 2013.
23. Коновалова З.Н., Орлова О.Р. Нестерпимая головная боль, спасение ботулотоксином. Метаморфозы. 2014; 7: 90-93.
24. Коновалова З.Н., Орлова О.Р. Применение ботулотоксина типа А (БТА) при реабилитации пациентов с миофасциальным болевым синдромом (Тезисы докл.).
25. Aoki K.R. Review of a proposed mechanism for the antinociceptive action of botulinum toxin type A. NeuroToxicol. 2005; 26: 785-793.
26. Goadsby P.J., Edvinsson L. The trigeminovascular system and migraine: studies characterizing cerebrovascular and neuropeptide changes seen in humans and cats. Ann. Neurol. 1993; 33: 48-56.
27. Применение препарата Диспорт® (БТА) для лечения локального мышечного гипертонуса при фокальных дистониях, спастичности и других мышечно-тонических синдромах. Метаморфозы. 2015; 10: 70-80.
28. Девликамова Ф. И. Морфофункциональная организация скелетных мышц у больных с миофасциальным болевым синдромом. Автореферат дис. ... докт. мед. наук. Казань, 2004.
29. Коновалова З.Н., Орлова О.Р. Миофасциальные болевые синдромы: лечение локальными инъекциями ботулотоксина типа А (Релатокс). Метаморфозы. 2015; 10: 82-86.



## Первый случай нейроакантоцитоза в России

Ю.А. Селивёрстов, М.В. Костырева, А.А. Шабалина, Р.Н. Коновалов, С.Н. Иллариошкин

Научный центр неврологии (Москва)

### Описание клинического случая

В научно-консультативное отделение Научного центра неврологии обратился мужчина 38 лет. На консультацию он приехал в сопровождении матери и своего товарища и коллеги по работе. При осмотре предъявлял жалобы на выраженную нечёткость речи и неустойчивость при ходьбе. Мама пациента и его товарищ обращали также внимание на изменение в характере и поведении больного в виде замкнутости, которой ранее не наблюдалось.

*Анамнез жизни и заболевания (сбран со слов матери пациента и его товарища).* Общий анамнез не отягощён. В детстве рос и развивался, не отличаясь от сверстников. Около полутора лет назад переехал жить один, стал редко контактировать с семьёй и в течение почти полугодия только эпизодически виделся с матерью, которая при редких встречах замечала у пациента изменения в характере, а также «синяки» на теле, шрамы и раны (в т.ч. были порваны ушные раковины), значительное снижение массы тела. На вопросы матери о причинах перечисленных явлений пациент отвечал, что «падал». Со слов коллеги по работе, с трудовыми обязанностями в это время справлялся хоть иногда и не очень быстро, но, в целом, удовлетворительно (работал курьером). Спустя полгода пациент вернулся жить вместе с матерью, которая обнаружила его «бледным, худым», с нечёткой речью, нарушенной координацией движений и шатающейся походкой. Выраженность этих нарушений прогрессирует и по настоящее время.

Обследовался в различных клиниках г. Москвы с диагнозами «энцефалопатия неясного генеза», «подострая энцефаломиелополинейропатия». Диагностировались мозжечковый, пирамидный, гипокинетический синдромы и нарушение когнитивных функций (последнее не было детализировано в представленной пациентом документацией). Предполагался нейродегенеративный процесс. На фоне неспецифической терапии (витамины и пр.) положительной динамики не отмечалось.

До обращения в Центр проводилось дообследование, в рамках которого были исключены болезнь Гоше (активность  $\beta$ -D-галактозидазы,  $\beta$ -D-глюкозидазы и хитотриозидазы в норме), GM2-ганглиозидозы (активность гексозаминидазы общая и А — в пределах нормы), болезнь Ниманна–Пика типа С (содержание холестерина-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -триола и 7-кетохолестерина в пределах нормы). Антитела к ВИЧ, бледной трепонеме и вирусу гепатита С, а также HBsAg не выявлены.

В общем анализе крови обращала на себя внимание лёгкая анемия в виде снижения содержания гемоглобина до 118 г/л (норма 132–173 г/л) и эритроцитов до 3,98 млн/мкл (норма 4,3–5,7 млн/мкл). Содержание в крови витамина B12, ТТГ, свободного Т4, АЛТ, АСТ, билирубина, креатинина, мочевины, общего холестерина и его фракций, церулоплазмينا, меди, железа и марганца — в пределах нормы.

При ЭКГ выявлялась синусовая аритмия (55–80 ударов/мин; на фоне синусовой брадикардии зафиксирован эпизод ускоренного предсердного ритма).

При транскраниальной магнитной стимуляции и электронейромиографии (ЭГНМГ) (выполнялись за полгода до осмотра в ФГБНУ НЦН): грубое поражение волокон пирамидных путей; данных за полинейропатию не получено.

МРТ шейного и грудного отдела позвоночника — без клинически значимых особенностей.

При МРТ головного мозга, проведённой за полгода до осмотра в Центре, отмечалось незначительное расширение, преимущественно, внутренних ликвороносных пространств.

*Семейный анамнез.* Детей нет. Есть родная сестра 31 года (клинически здорова). Отец скончался в 55 лет (значительно злоупотреблял алкоголем; подробностей смерти нет). Мама жива, клинически здорова.

При текущем осмотре (спустя полтора года после предполагаемого дебюта заболевания) у пациента отмечались множественные линейные рубцы на коже лица и спины (вероятно, посттравматические), посттравматическая (?) деформация ушных раковин, гипотрофия мышц плечевого пояса. При офтальмоскопии клинически значимых изменений глазного дна не выявлено. При осмотре роговицы кольца Кайзера–Флейшера не определялись.

*Неврологический статус.* В сознании; менингеальных знаков нет; контакт с пациентом значительно затруднён из-за грубой дизартрии; толчкообразные следящие движения глаз, замедление скорости вертикальных саккад, лёгкое ограничение взора вверх; грубые дисфония и дизартрия. Глубокие рефлексы симметрично повышены; симптом Бабинского с двух сторон; мышечный тонус повышен по смешанному типу в руках и ногах. Выраженная брадикинезия; генерализованный дистонический синдром с вовлечением мышц рук, ног, шеи; дисдиадохокинез; пальценосовая проба — с дискоординацией с обеих сторон, пяточно-коленная проба — неуверенно; положительная проба Бабинского на асинергию; сенситивная атаксия (положительная проба Ромберга); ходьба в пределах помещения возможна только с посторонней помощью, пациент передвигается преимущественно в инвалидном кресле. Тест с рисованием часов выполнил с ошибками и признаками зрительно-пространственных нарушений (рис. 1). Не может выполнить тест Лурии.

Таким образом, в клинической картине имеются мозжечковый, пирамидный, дистонический синдромы, глазодвигательные нарушения, симптомы поражения проводников глубокой чувствительности (сенситивная атаксия при отсутствии на ЭНМГ признаков полинейропатии) в сочетании с поведенческими и когнитивными изменениями. В течение полутора лет заболевание имеет прогрессирующий характер. Ряд болезней обмена при этом уже был исключён. В лабораторных исследованиях по общему анализу крови выявлена лёгкая анемия. Безусловно, наличие почти полугодичного периода, про который полностью отсутствует какая-либо информация, не позволяет исключить экзогенное поражение нервной системы.

Вместе с тем, создаётся впечатление, что поведенческие нарушения предшествовали всем остальным и могли послужить причиной внезапного решения пациента жить отдельно, резко сократив общение с родственниками. В связи с этим, если допустить наличие за тот полугодовой период воздействие каких-либо неблагоприятных внешних факторов (например, употребление токсичных или психоактивных веществ и т.п.), то они, скорее, могли усугубить течение заболевания, но не явиться его причиной.

Учитывая выявленную при осмотре гипотрофию мышц плечевого пояса, нами было назначено дообследование, при котором выявлены лёгкое повышение активности креатинфосфокиназы (до 374 Ед/л при норме — менее 190 Ед/д) и лактатдегидрогеназы (до 245 Ед/л при норме 125–220 Ед/л); активность креатинфосфокиназы-МВ, а также содержание мочевой кислоты, С-реактивного белка и лактата оказались в пределах нормальных значений. Фиброэзофагогастроуденоскопия и колоноскопия — без особенностей. При проведении МРТ головного мозга в динамике отмечается лёгкая гипотрофия червя мозжечка, ствола головного мозга, а также расширение боковых желудочков головного мозга (вероятно, вследствие нейродегенеративного процесса базальных ядер и, в частности, хвостатого ядра); в сравнении с предыдущим исследованием — прогрессирование атрофического процесса (см. рис. 2).

Учитывая особенности клинической картины, наличие лёгкой анемии неясного генеза, выявленные повышение активности в крови креатинфосфокиназы в сочетании с нейровизуализационными признаками нейродегенеративного процесса, пациенту было проведено микроскопическое исследование мазка крови, при котором были выявлены множественные акантоциты (рис. 3).

На основании полученных нами данных можно сделать вывод о наличии у пациента синдрома *нейроакантоцитоза*. При исследовании мазка крови у родной сестры пациента акантоцитов не было выявлено.

### Обсуждение

Нейроакантоцитозы (НА) представляют собой генетически разнородную группу заболеваний, характеризующихся наличием неврологических и иных проявлений в сочетании с выявлением в крови акантоцитов (от греч. шип, *por*) — эритроцитов со множественными шипообразными выростами. Неврологические проявления многообразны и, как правило, включают в себя различные двигательные расстройства, атаксию, личностные изменения, когнитивные нарушения, аксональную полинейропатию и эпилептические приступы. При микроскопии мазка крови пациентов выявляются эритроциты (как правило, 10–30%) с необычной звёздчатой формой из-за наличия у них множественных шипиковых выростов. Таким образом, понятие НА подразумевает под собой синдром и требует, по возможности, нозологического уточнения.

До сегодняшнего дня отсутствует единое мнение относительно того, какие именно заболевания следует включать в группу НА. Это связано с постоянно растущим объёмом знаний по молекулярным и биологическим основам рассматриваемых болезней. Формально, НА можно разделить на две большие группы.

К первой группе относятся НА, сопровождаемые нейродегенерацией базальных ядер, что приводит к развитию двигательных, когнитивных и психопатологических нарушений. Основными представителями этой группы являются два заболевания: аутосомно-рецессивная хорея-акантоцитоз (ХА) вследствие мутации в гене *VPS13A* и рецессивный X-сцепленный синдром Маклеода (СМ) вследствие мутации в гене *XK*. Несмотря на мутации в разных генах, функции которых не связаны, эти два заболевания имеют много общих черт, включая поражение центральной и периферической нервной системы, гепатоспленомегалию и акантоцитоз. Такое фенотипическое перекрытие нередко приводило к терминологической путанице в литературе. Так, ряд исследователей полагает, что термин ХА не совсем корректен, т.к. ни хорея, ни акантоцитоз не являются обязательными или неизменными атрибутами мутаций в гене *VPS13A*. Вместе с тем, с дидактической точки зрения, этот термин представляется удобным, т.к. имеет чёткие молекулярно-генетические ассоциации, в то время как НА исторически является более общим термином [1].

ХА характеризуется дебютом во взрослом возрасте с двигательных, когнитивных и психопатологических нарушений, которые могут напоминать таковые при болезни Гентингтона. Из двигательных расстройств могут наблюдаться хорея, дистония и тики. Характерной является орофациальная дистония с выведением языка и прикусыванием языка и губ. Психические и когнитивные нарушения схожи с таковыми при болезни Гентингтона, однако, в отличие от последней, у половины пациентов встречаются эпилептические приступы; нередко также отмечаются дистальные амиотрофии, полинейропатия и (или) повышение активности креатинфосфокиназы в сыворотке крови.

СМ — X-сцепленное рецессивное заболевание, развивающееся вследствие мутации в гене *XK*, кодирующем белок, необходимый для экспрессии на поверхности эритроцитов антигенов группы Kell. При этом заболевании часто наблюдается хорея с вовлечением конечностей и лицевые тики, дистония же бывает выражена реже, по сравнению с ХА. СМ может также сопровождаться аксональной полинейропатией, деменцией подкоркового типа, психопатологическими нарушениями, кардиомиопатией и гемолитической анемией. В силу типа своего наследования в подавляющем большинстве случаев СМ страдают мужчины, у женщин же заболевание развивается в случае гомозиготного носительства мутации. Тем не менее, в редких случаях у гетерозиготных носительниц мутации в гене *XK* в мазке крови могут выявляться акантоциты, что может сопровождаться двигательными нарушениями, характерными для СМ.

Ко второй группе НА относятся наследственные нарушения обмена липопротеинов, а именно абеталипопротеинемия (синдром Бассена–Корнцвейга) и гипобеталипопротеинемия. Эти заболевания сопровождаются полинейропатией и атаксией с дегенерацией задних столбов спинного мозга вследствие мальабсорбции витамина Е. Примечательно, что у таких пациентов не выявляются насильственные движения и когнитивные нарушения. Причиной акантоцитоза при этих заболеваниях является нарушение всасывания в желудочно-кишечном тракте липидов и жирорастворимых витаминов, что влияет на состав мембраны эритроцитов.

Первые описания НА, сопровождающихся нейродегенерацией базальных ядер, встречаются в публикациях 1960-е гг. под эпонимом «синдром Левина–Кричли». Пациенты, описанные Кричли, укладываются в классический фенотип ХА, а генетическое обследование здоровых родственников описанного Кричли пациента из Кентукки подтверждает этот диагноз [4]. Вместе с тем, тип наследования и клиническая картина заболевания в семье, описанной Левиным, не очень чётко вписывается в рамки ХА или СМ, а генетическое тестирование ни самих пациентов, ни их потомков не было возможным, в связи с чем эпоним «синдром Левина–Кричли» является неточным и от его использования следует воздерживаться [1].

Одной из наиболее цитируемых работ по НА является описание Hardie et al. 19 случаев с этим синдромом [3]. С развитием молекулярно-генетических методов диагностики обнаружилось, что эта группа включала пациентов как с ХА и СМ, так и с пантотенаткиназа-ассоциированной нейродегенерацией (РКАН) [2]. В настоящее время считается, что если диагноз у пациентов с НА не был уточнён молекулярно-генетически, то такие случаи следует рассматривать как вероятные ХА либо СМ. Кроме того, около 10 % случаев таких редких заболеваний, как уже упомянутая РКАН и гентингтоноподобное заболевание 2-го типа (HDL2) могут сопровождаться акантоцитозом. РКАН, ранее известная как болезнь Галлервордена–Шпатца, развивается вследствие мутации в гене *PANK2*, кодирующем пантотенаткиназу-2, имеет аутосомно-рецессивный тип наследования и может сопровождаться разнообразными двигательными расстройствами. При этом заболевании характерной является картина, выявляемая при магнитно-резонансной томографии головного мозга, носящая название «глаз тигра».

Развитие HDL2 обусловлено СТG-экспансией в гене *JPH3*, кодирующем юнктофилин-3; это заболевание является очень редким — исключение составляют жители Африки, где HDL2 встречается почти так же часто, как и болезнь Гентингтона.

Опубликованы также единичные описания пациентов и семей, в которых акантоциты выявлялись на фоне иных состояний, например, при пароксизмальной дискинезии или митохондриальной патологии.

Учитывая описанные особенности различных групп НА, у нашего пациента можно предполагать наличие заболевания из первой группы — НА с нейродегенерацией базальных ядер. Принимая во внимание выявленные дистонический синдром, повышение активности креатинфосфокиназы и наличие мышечных гипотрофий плечевого пояса, нами планируется, в первую очередь, исключать мутации в гене *VPS13A*.

#### Литература

1. Gálvez-Jiménez N., Tuite P.J. Uncommon causes of movement disorders. Cambridge: Cambridge University Press, 2011.
2. Gandhi S., Hardie R.J., Lees A.J. An update on the Hardie neuroacanthocytosis series. In: Walker R.H., Saiki S., Danek A. (eds). Neuroacanthocytosis Syndromes II. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 2008: 43–51.
3. Hardie R.J., Pullon H.W., Harding A.E. et al. Neuroacanthocytosis. A clinical, haematological and pathological study of 19 cases. Brain. 1991; 114: 13–49.
4. Velayos-Baeza A., Holinski-Feder E., Neitzel B. et al. Chorea-acanthocytosis genotype in the original Critchley Kentucky neuroacanthocytosis kindred. Arch. Neurol. 2011; 68: 1330–1333.



## Лобно-височная деменция: новые аспекты молекулярной диагностики у российских пациентов

Е.Ю. Федотова, Д.А. Гришина, Н.Ю. Абрамычева, А.С. Ветчинова, Е.О. Иванова,  
М.С. Степанова, Н.Н. Яхно, С.Н. Иллариошкин

Научный центр неврологии;  
Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Москва)

Лобно-височная деменция (ЛВД) представляет собой значимую медико-социально-экономическую проблему, находясь на стыке психиатрии, неврологии, в последнее время – также генетики и клеточной биологии. ЛВД является одной из самых распространенных деменций пресенильного возраста, продолжительность жизни пациентов после манифестации заболевания, по разным данным, составляет в среднем 8–10 лет. Клиническая картина заболевания характеризуется расстройством личности и поведения с расторможенностью и/или апатико-абулическим синдромом в отсутствие первичных нарушений памяти, праксиса, гнозиса. ЛВД – это спектр клинических синдромов с выраженной гетерогенностью клинической картины, генетических причин и нейropатологических изменений. Терапия ЛВД, к сожалению, до настоящего времени остается симптоматической и не предотвращает дальнейшее прогрессирование патологического процесса [1, 2].

Клинически в спектре ЛВД выделяют поведенческий вариант ЛВД (собственно ЛВД, или болезнь Пика) и два варианта первичных прогрессирующих афазий – семантическая деменция и афазия со снижением беглости речи/аграмматический вариант [3]. ЛВД также пересекается клинически и патогенетически с такими нейродегенеративными заболеваниями, как кортико-базальная дегенерация, прогрессирующий надъядерный паралич и боковой амиотрофический склероз [4]. В некоторых случаях клиническая диагностика ЛВД осложнена признаками, более характерными для болезни Альцгеймера или, реже, для деменции с тельцами Леви. Так, например, известный логопенический вариант первичной прогрессирующей афазии патоморфологически характеризуется в подавляющем большинстве случаев отложениями в мозге бета-амилоида [5].

Патоморфологически ЛВД часто описывается как лобно-височная лобарная дегенерация с асимметричной атрофией лобных и/или височных долей. Атрофия, в свою очередь, сопровождается патологическими внутриклеточными включениями белков тау, TDP43, FUS или убиквитиновыми включениями [6–8].

Известно несколько генов, вовлеченных в патогенез ЛВД. Наиболее часто встречаются мутации в генах *C9orf72*, *MAPT* и *GRN*. Реже при ЛВД встречаются мутации в генах *CHMP2B*, *VCP*, *SQSTM1*, *TBK1*, *UBQLN2*, еще реже – *TARDBP*, *FUS* [3].

После открытия гена *C9orf72* в 2011 году многочисленными работами была подтверждена достаточно высокая частота встречаемости гексануклеотидной GGGGCC-экспансии в первом интроне гена *C9orf72* среди случаев ЛВД и бокового амиотрофического склероза. Среди семейных случаев ЛВД встречаемость мутации составляет 3–48%, среди спорадических – 2–23%, а при сочетании ЛВД с боковым амиотрофическим склерозом – 10–88% [9–11]. Клинически наиболее часто мутация проявляется поведенческим вариантом ЛВД или фенотипом ЛВД с признаками бокового амиотрофического склероза. Обсуждаются несколько взаимодополняющих молекулярных механизмов, через которые может реализовываться патологическое действие экспансии в гене *C9orf72*: гаплонедостаточность, образование в нейронах РНК-фокусов с сестрацией РНК-связывающих белков и RAN-зависимая трансляция области экспансии, приводящая к образованию повтор-содержащих белков [12]. Патоморфологически экспансия в гене *C9orf72* представлена патологией с TDP43-включениями [13].

Гиперфосфорилированные, нерастворимые включения тау-белка, ассоциированного с микротрубочками, являются ключевым признаком так называемых таупатий, к которым относятся ЛВД, прогрессирующий надъядерный паралич, кортико-базальная дегенерация, болезнь Альцгеймера. Причинная связь развития ЛВД с патологией тау-белка была доказана открытием мутаций в гене тау-белка – *MAPT*. Мутации в этом гене располагаются или в кодирующей части, или локализованы в интронных участках, задействованных в альтернативном сплайсинге [14, 15]. Альтернативный сплайсинг приводит к образованию 6 изоформ белка, в структуру которых входят 3 или 4 участка повторов, связывающихся с микротрубочками (соответственно, 3R и 4R). Считается, что баланс между 3R и 4R является критическим для нормального функционирования нейронов, которое нарушается в случаях мутаций в гене *MAPT*. Клинически мутации *MAPT* представлены, кроме поведенческого варианта ЛВД, афазией со снижением беглости речи, а также экстрапирамидными нарушениями. Частота встречаемости мутаций *MAPT* по различным данным составляет от 5 до 20% всех семейных случаев ЛВД [3].

Мутации в гене *GRN*, как считается, ответственны за 25% семейных случаев ЛВД, и их патогенность связана с потерей функции белка [16]. Патоморфологическая картина представлена включениями белка TDP-43 и асимметричной атрофией, затрагивающей передние отделы височной доли, височно-теменные и лобные области. Мутации *GRN* клинически могут быть представлены поведенческим вариантом ЛВД, афазией со снижением беглости речи, кортико-базальным синдромом [3].

Выявление редко встречаемых мутаций в других генах стало более реальным в последние несколько лет благодаря появлению новой молекулярно-генетической технологии – секвенирования следующего поколения (Next Generation Sequencing, NGS). NGS обеспечивает параллельный анализ сотен выбранных генов или даже тотальное секвенирование всего генома [17–20]. Известны три основные стратегии применения технологии NGS на практике: полногеномное секвенирование, полноэкзомное секвенирование и панельное секвенирование [21]. Из них панельное секвенирование представляет больший интерес для клинической практики: панели для NGS-анализа могут включать от 15–20 до нескольких сотен генов. Как было показано, применение панельного секвенирования при скрининге диагностически неясных случаев может выявлять мутации в различных генах более чем в 25–30% случаев [22]. Возможности применения панельного NGS-анализа для случаев ЛВД до настоящего времени не исследовались.

### Материалы и методы

При выполнении исследования была сформирована выборка больных с ЛВД ( $n=22$ ), возраст в группе составил  $61\pm 11,5$  года, длительность заболевания  $3,2\pm 2,3$  года. Поведенческий вариант ЛВД наблюдался у 14 пациентов, тогда как у 8 – первичная прогрессирующая афазия (аграмматический и семантический варианты, пациенты с логопеническим вариантом были исключены из выборки и не исследовались). У 8 пациентов наблюдался отягощенный семейный анамнез, у одного пациента в клинической картине дополнительно присутствовали признаки поражения мотонейрона. В каждом случае был проведен скрининг генов *C9orf72* (гексануклеотидная экспансия в первом интроне), *MAPT* (поиск мутаций во всех кодирующих областях и интронах 10–12, важных для сплайсинга), *GRN* (поиск мутаций в экзонных областях). Для ДНК-скрининга применялись наиболее современные молекулярно-генетические методы: ПЦП с дополнительным праймером на область повторов, фрагментный анализ, капиллярное секвенирование с флуоресцентной детекцией.

У двух пациентов без выявленных вышеуказанными методами генетических нарушений был проведен мутационный скрининг с применением разработанной нами оригинальной диагностической таргетной мультигенной NGS-панели, основанной на геномных технологиях нового поколения: панель ориентирована на секвенирование кодирующей области 300 генов наиболее значимых нейродегенеративных заболеваний, проявляющихся когнитивными и двигательными расстройствами. В их числе: спиноцереbellлярные атаксии – 136 генов; спастические параплегии – 43 гена; деменции – 23 гена; лейкодистрофии и лейкоэнцефалопатии – 22 гена; первичный паркинсонизм – 20 генов; боковой амиотрофический склероз – 20 генов; первичные дистонии – 16 генов; нейродегенерации с накоплением железа в мозге – 6 генов; первичная хореза – 6 генов; эссенциальный тремор – 4 гена; болезнь Фара – 3 гена; гепатолентикулярная дегенерация – 1 ген. В число кандидатных генов, ассоциированных с деменциями и включенных в данную NGS-панель, входят: *APP*, *APOE*, *BLMH*, *CHCHD10*, *CHMP2B*, *DCTN1*, *GRN*, *HFE*, *MPO*, *NEFH*, *NOS3*, *PACIP1*, *PLAU*, *PSEN1*, *PSEN2*, *SIGMAR1*, *SORL1*, *SPG11*, *SQSTM1*, *TARDBP*, *TMEM106B*, *TREM2*, *VCP*; в число генов, ассоциированных с боковым амиотрофическим склерозом, которые могут также проявляться синдромом ЛВД – гены *FUS* и *UBQLN2*. Таким образом, панель покрывает все известные гены ЛВД и ассоциированных с ЛВД нейродегенеративных патологий. Все положительные находки подтверждались методом стандартного сэнгеровского секвенирования. Для выявленных известных вариантов мутаций проводилась оценка их патогенности с помощью баз данных: NCBI Genome, 1000 Genomes Project, Human Gene Mutation Database; dbSNP; OMIM; ClinVar. Если найденный вариант не был ранее описан в литературе и не представлен ни в одной из баз данных, либо сведения о нем недостаточны для решения о его значимости, такой нуклеотидный вариант обрабатывался в программах предсказания патогенности: SIFT, PolyPhen2, FATNMM, MutationAssessor, MutationTaster.

### Результаты

В исследованной выборке были выявлены три носителя мутаций (13,6%) в генах *C9orf72*, *GRN*, *SQSTM1*.

Экспансия *C9orf72* была выявлена с помощью фрагментного анализа у пациентки В., 45 лет. Дебют заболевания – 4 года назад с нарушений речи (трудности в подборе слов, односложные ответы на вопросы, ошибки в словах при работе за компьютером). Данные расстройства стали вызывать затруднения на работе, с которой пациентка была вынуждена уволиться. Супруг пациентки также отметил изменения в поведении (сужение круга интересов, эмоциональную холодность к родственникам). Трудностей с ориентировкой на местности не отмечается. Нарушения речи вызывают беспокойство пациентки, но не мешают бытовой адаптации: полностью себя обслуживает, выполняет домашнюю работу, водит дочь в детский сад и на кружки. Семейный анамнез без особенностей. При осмотре: в сознании, контактна, полностью ориентирована в месте и времени, критика к своему состоянию сохранена. Оживлены рефлексы орального автоматизма (хоботковый). Легкая дизартрия. Гипомимия. Двигательных, чувствительных и тазовых нарушений нет. Нейропсихологическое обследование: легкие нарушения памяти, связанные со снижением активности и избирательности воспроизведения, трудности усвоения моторных серий в пробе на динамический праксис. Значительные нарушения речи с динамической и элементами эфферентной моторной афазии с вербальными персеверациями, аграмматизмами. Понимание речи сохранено, номинативная функции речи не нарушена. На МРТ головного мозга – умеренное асимметричное расширение субарахноидальных пространств в проекции лобных долей головного мозга слева. В связи с вышеперечисленным, пациентке был поставлен диагноз «лобно-височная деменция с синдромом первичной прогрессирующей афазии со снижением беглости речи».

Мутация в гене *GRN*, в 12-м экзоне, приводящая к аминокислотной замене R579C, была выявлена с помощью секвенирования данного гена у пациента П., 56 лет. Со слов жены, в течение 3 лет у пациента постепенно прогрессируют нарушения речи в виде трудностей в назывании предметов. Иногда не понимает значения слов в устной речи, при чтении. Трудностей с ориентировкой на местности не отмечает. В течение последних 6 месяцев появились затруднения при выполнении мужской работы по дому, пациент отказался водить автомобиль. Отмечаются также нарушения в эмоциональной и поведенческой сфере – пропал интерес к прежним увлечениям, стал более раздражительным. Семейный анамнез без особенностей. При осмотре: в сознании, контактен, правильно ориентирован во времени, но не может назвать клинику, в которой находится. Речь пациента беглая, развернутая, грамматически правильная, обеднена существительными с вербальными парафазиями. Оживлены рефлексы орального автоматизма. Легкий феномен противоудержания. Других двигательных, а также чувствительных и тазовых нарушений нет. При нейропсихологическом обследовании обнаружены умеренно выраженные модально-неспецифические нарушения памяти по механизму повышенной тормозимости следов интерференцией и снижения активности мнестической деятельности. В двигательной сфере: легкие трудности усвоения и удержания моторных серий в пробе на «динамический праксис». Умеренные нарушения управляющих функций с нарушением программирования и контроля. Умеренные симптомы амнестической и семантической дисфазии. Подсказка первого слога неэффективна. На МРТ головного мозга – умеренная наружная атрофия, более выраженная в левой височной доле. На основании клинко-анамнестических данных

был поставлен диагноз «лобно-височная деменция с синдромом первичной прогрессирующей афазии без снижения беглости речи».

Мутация в гене *SQSTM1*, находящаяся в 1-м экзоне и приводящая к аминокислотной замене R46W, была выявлена с помощью таргетного NGS-анализа. Мутация подтверждена прямым секвенированием по Сэнгеру и оценена программами Polyphen2 и MutationTaster как патогенная. Носитель мутации, больной П., 51 года, обратился с жалобами на трудности в понимании слов в устной речи, при чтении, при назывании предметов. Считает себя больным около четырех лет, когда появились и стали прогрессировать нарушения понимания речи, состоящей из сложносоставных предложений, затем возникли трудности при понимании простых слов в обращенной речи, речь пациента стала односложной, бедная существительными. Пациент относительно адаптирован, продолжает водить машину. На проведенной МРТ определяется атрофия височной области, выраженная преимущественно слева. При осмотре критика к своему состоянию сохранена, речь пациента беглая, грамматически правильная, бедная существительными, часты вербальные парафазии, выраженные нарушения понимания обращенной речи с непониманием существительных, при письме под диктовку ошибок не совершает, но при этом не полностью понимает написанное, выраженные нарушения номинативной функции речи, подсказка первого слога не эффективна, повторная речь и чтение вслух не нарушены. В семейном анамнезе: подобные нарушения были у отца с возраста 60 лет и у деда со стороны отца с возраста 70 лет, старший брат клинически здоров. Таким образом, на основании клинической картины и анамнеза заболевания пациенту поставлен диагноз «лобно-височная деменция, семантический вариант первичной прогрессирующей афазии».

### Заключение

Несмотря на то, что ЛВД является второй по частоте (после болезни Альцгеймера) формой среди всех пресенильных деменций, молекулярные и клеточные основы данного заболевания остаются малоизученными, а данные по генетике ЛВД у российских пациентов на настоящий момент отсутствуют. В связи с этим в работе был проведен мутационный скрининг генов *C9orf72*, *MAPT* и *GRN*. С целью выявления редких молекулярно-генетических форм была использована технология секвенирования нового поколения – оригинальная панель, включающей экзомы 300 генов нейродегенеративных заболеваний, проявляющихся когнитивными и двигательными расстройствами.

В результате работы каузальные мутации были выявлены в 13,6% случаев, в том числе выявлен случай с редкой мутацией в гене *SQSTM1*. Приведены подробные клинико-анамнестические данные носителей мутаций. Стоит отметить, что у всех носителей мутаций в клинической картине доминировали афатические нарушения. Скорее всего, этот факт можно объяснить особенностями выборки, в которой более трети составили пациенты с первичной прогрессирующей афазией – достаточно редким фенотипом деменции.

Первые полученные данные по молекулярно-генетической структуре ЛВД в российской популяции планируется уточнять, так как, в свою очередь, выявление первичного генетического дефекта при ЛВД является основой для реализации принципов персонализированной медицины и ключом к разработке патогенетически обоснованной терапии данного заболевания.

### Литература

1. Степкина Д.А., Захарова В.В., Яхно Н.Н. Синдром первичной прогрессирующей афазии. Неврологический журнал. 2014; 5: 22-28.
2. Левин О.С. Диагностика и лечение деменции в клинической практике. М.: МЕДпресс-информ, 2010.
3. Bang J., Spina S., Miller B.L. Frontotemporal dementia. Lancet. 2015; 386: 1672-1682.
4. Rohrer J.D., Isaacs A.M., Mizielinska S. et al. C9orf72 expansions in frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis. Lancet Neurol. 2015; 14: 291-301.
5. Teichmann M., Kas A., Boutet C et al. Deciphering logopenic primary progressive aphasia: a clinical, imaging and biomarker investigation. Brain. 2013; 136: 3474-3488.
6. Lashley T., Rohrer J.D., Mead S., Revesz T. Review: an update on clinical, genetic and pathological aspects of frontotemporal lobar degenerations. Neuropathol. Appl. Neurobiol. 2015; 41: 858-881.
7. Mackenzie I.R.A., Neumann M., Baborie A.A et al. Harmonized classification system for FTL-D-TDP pathology. Acta Neuropathol. 2011; 122: 111-113.
8. Sieben A., Van Langenhove T., Engelborghs S. et al. The genetics and neuropathology of frontotemporal lobar degeneration. Acta Neuropathol. 2012; 124: 353-372.
9. Wollacott I.O.C., Mead S. The C9orf72 expansion mutation: gene structure, phenotypic and diagnostic issues. Acta Neuropathol. 2014; 127: 319-332.
10. Liu Y., Yu J.-T., Zong Y. C9orf72 mutations in neurodegenerative disease. Mol. Neurobiol. 2014; 49: 386-398.
11. Shu L., Sun Q., Zhang Y. et al. The association between C9orf72 repeats and risk of Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis: A meta-analysis. Parkinsons Dis. 2016; 2016: 5731734.
12. Yokoyama J.S., Sirkis D.W., Miller B.L. C9orf72 hexanucleotide repeats in behavioral and motor neuron disease: clinical heterogeneity and pathological diversity. Am. J. Neurodegener. Dis. 2014; 3: 1-18.
13. Fratta P., Poulter M., Lashley T. Homozygosity for the C9orf72 GGGGCC repeat expansion in frontotemporal dementia. Acta Neuropathol. 2013; 126: 401-409.
14. Ghetti B., Oblak A.L., Boeve B.F. et al. Invited review: Frontotemporal dementia caused by microtubule-associated protein tau gene (MAPT) mutations: a chameleon for neuropathology and neuroimaging. Neuropathol. Appl. Neurobiol. 2015; 41: 24-46.
15. Rossi G., Tagliavini F. Frontotemporal lobar degeneration: old knowledge and new insight into the pathogenetic mechanisms of tau mutations. Front. Aging Neurosci. 2015; 7: 192.
16. Petkau T.L., Leavitt B.R. Progranulin in neurodegenerative disease. Trends Neurosci. 2014; 37: 388-398.
17. Metzker M.L. Sequencing technologies – the next generation. Nat. Rev. Genet. 2010; 11: 31-46.
18. Erdmann J. Next generation technology edges genome sequencing toward the clinic. Chem. Biol. 2011; 18: 1513-1514.
19. Pareek C.S., Smoczynski R., Tretyn A. Sequencing technologies and genome sequencing. J. Appl. Genet. 2011; 52: 413-435.
20. Xue Y., Ankala A., Wilcox W.R., Hegde M.R. Solving the molecular diagnostic testing conundrum for Mendelian disorders in the era of next-generation sequencing: single-gene, gene panel, or exome/genome sequencing. Genet. Med. 2015; 17: 444-451.
21. Warman Chardon J., Beaulieu C., Hartley T. et al. Axons to exons: the molecular diagnosis of rare neurological disease by next-generation sequencing. Curr. Neurol. Neurosci. Rep. 2015; 15: 64.
22. Farwell K.D., Shahmirzadi L., El-Khechen D. et al. Enhanced utility of family-centered diagnostic exome sequencing with inheritance model-based analysis: results from 500 unselected families with undiagnosed genetic conditions. Genet. Med. 2015; 17: 578-586.



# Экстрапирамидные нарушения при ВИЧ-инфекции

Г.А. Прянишникова

Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования,  
Центр экстрапирамидных заболеваний (Москва)

Возможности современной фармакотерапии постепенно приводят к тому, что ВИЧ-инфекция превращается из фатального заболевания в хронический, контролируемый инфекционный процесс. С другой стороны, рост числа лиц с положительным ВИЧ-статусом, трудности организации своевременной диагностики и удержания таких пациентов в программах оказания специализированной помощи ведут к увеличению количества больных с ВИЧ-энцефалопатией или оппортунистическими инфекциями.

В последнее время экстрапирамидные расстройства все чаще упоминаются в качестве осложнений ВИЧ-инфекции [3, 4, 9]. Так, согласно некоторым данным, экстрапирамидные нарушения у ВИЧ-положительных пациентов выявлялись лишь в 2–3% случаев [5, 11], но при более тщательном анализе в проспективных исследованиях клинические признаки дисфункции базальных ганглиев, особенно тремор и паркинсонизм, были обнаружены у 5–44% пациентов со СПИД [6–8, 10]. Такой разброс в оценке двигательных нарушений говорит о трудностях их диагностики.

Экстрапирамидные расстройства у ВИЧ-инфицированных пациентов могут быть обусловлены первичным поражением структур nigростриарной дофаминергической системы в рамках ВИЧ-энцефалопатии (ВИЧ-ассоциированной деменции), вторичным инфекционным процессом в нервной системе (токсоплазмоз, туберкулез, криптококковые гранулемы), а также следствием проводимой терапии (лекарственные взаимодействия между антиретровирусными и другими препаратами) или употребления наркотических средств.

## Экстрапирамидные нарушения при ВИЧ-энцефалопатии (ВИЧ-ассоциированной деменции)

В литературе имеются описания ВИЧ-положительных пациентов с паркинсонизмом, тремором и дистониями в отсутствие оппортунистических заболеваний, что подразумевает ВИЧ-инфекцию как причину экстрапирамидных патологических симптомов [7, 12, 13, 16]. При проведении МРТ у пациентов с нейроСПИД наблюдалась атрофия базальных ганглиев, которая коррелировала с тяжестью ВИЧ-энцефалопатии [14, 15].

Паркинсонизм является наиболее частым экстрапирамидным осложнением и имеет ряд особенностей: двустороннее начало, быстрое развитие постуральной неустойчивости, отсутствие типичного тремора покоя [4, 13, 16]. Даже в дебюте заболевания, при отсутствии клинически выраженного неврологического дефицита, моторные тесты нередко выявляют замедление быстрых чередующихся движений пальцев рук и наличие постурального тремора [1, 13].

По данным Arendt et al., паркинсонизм определялся у половины ВИЧ-инфицированных пациентов с экстрапирамидными расстройствами и ассоциировался с относительно быстрым летальным исходом. Таким образом, раннее развитие паркинсонизма оказалось плохим прогностическим признаком у больных СПИД [10]. Наличие двигательных нарушений указывает на более тяжелое поражение головного мозга и, возможно, в ряде случаев может выступать в роли предиктора неблагоприятного исхода.

На фоне лечения леводопой признаки паркинсонизма у пациентов с ВИЧ-инфекцией могут уменьшиться, но окончательный их регресс происходит, как правило, при приеме высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ) [17]. По данным De Rosso et al., эффект от назначения препаратов леводопы без ВААРТ у пациентов с ВИЧ-инфекцией не превышал 50%, а при сочетании ВААРТ с леводопой или пирибедилом наблюдалось значительное уменьшение симптомов паркинсонизма [11].

Постуральный тремор или тремор покоя у больных СПИД встречается примерно в 10% случаев [9]. Хорея и баллизм также периодически упоминаются при описании двигательных нарушений у пациентов с ВИЧ-инфекцией, но точную частоту встречаемости этих нарушений оценить трудно [4, 18, 19]. Генерализованная или сегментарная дистония считается редким проявлением нейроСПИД [20].

*Клинический пример.* Пациентка М., 29 лет. Жалобы на скованность, замедленность движений, неловкость в левой руке. В анамнезе употребление в/в наркотических препаратов (героин). ВИЧ-инфекция в течение 4 лет. Обследовалась в Клинической инфекционной больнице №2, анализы на оппортунистические инфекции – отрицательные. Получала лимивудин, даунонавир, ставудин, ритонавир (непостоянно).

В неврологическом статусе: черепные нервы без особенностей. Парезов нет, сухожильные рефлексы равномерно оживлены с нижних конечностей. Мышечный тонус слегка повышен по пластическому типу с 2-х сторон, тремора нет. Легкая гипомимия. Брадикинезии нет. Элементы дистонии в левой руке. Легкая неустойчивость в пробе Ромберга. Походка не изменена. Умеренное когнитивное снижение.

На МРТ головного мозга – очагов патологической плотности нет. Выраженные, относительно симметричные изменения в белом веществе мозга, гиперинтенсивные в режиме T2-ВИ, диффузные атрофические изменения.

Назначена леводопа-бенсеразид 150 мг в день, бипериден 4 мг в день. Наблюдение в специализированном центре, продолжение получать ВААРТ. При повторном осмотре через 8 месяцев на фоне проводимой терапии симптомы паркинсонизма практически регрессировали.



**Экстрапирамидные расстройства у ВИЧ-инфицированных пациентов с оппортунистическими заболеваниями**

Возникновение экстрапирамидных нарушений у пациентов с ВИЧ-инфекцией часто обусловлено оппортунистическими заболеваниями на фоне выраженных иммунных нарушений. Так, например, церебральный токсоплазмоз часто проявляется сегментарной или фокальной дистонией, баллизмом, хореическим гиперкинезом или миоклониями. Односторонний асимметричный паркинсонизм наблюдается редко и, как правило, связан с токсоплазмозным абсцессом, туберкулемой, прогрессирующей мультифокальной лейкоэнцефалопатией [20].

Тремор Холмса может возникать в результате поражения среднего мозга при туберкулезе, токсоплазмозе или новообразованиях в этой области, иногда в сочетании с офтальмоopleгией или контралатеральным гемипарезом [5, 21]. De Mattos et al. описали пациента с тремором Холмса, связанным с туберкулемами в среднем мозге и мозжечке. В дальнейшем, тремор и изменения в головном мозге разрешились при лечении туберкулеза [22].

*Клинический пример.* Пациент А., 37 лет. Жалобы на неловкость и слабость в правой руке, периодически возникающие подергивания в ней. Из анамнеза: ВИЧ-инфекция обнаружена 2 года назад. Проходил обследование и лечение в Клинической инфекционной №2, в крови были выявлены антитела IgM, IgG к токсоплазме, ПЦР крови положительная на цитомегаловирус. Получал калетру, ламивудин, абакавир, вальцит, ко-тримоксазол в/в, затем бисептол в течение нескольких месяцев.

На МРТ головного мозга: два патологических очага в базальных ганглиях и в области среднего мозга слева с умеренным перифокальным отеком. Показатель CD4 – 142 кл/мкл. В крови – выявляются антитела (IgM) к токсоплазме.

В неврологическом статусе: черепные нервы без особенностей. Правосторонний спастические гемипарез, сухожильные рефлексы D>S, оживлены; коленные D=S, живые. Мышечный тонус слегка повышен в правой руке, тремора нет. Миоклонические подергивания в правой руке. Походка не изменена.

Назначен клоназепам 1 мг в день с постепенным увеличением дозы до 4 мг в день. Рекомендовано обследование на оппортунистические инфекции, контроль вирусной нагрузки, уровня CD4-клеток в динамике. Наблюдение в специализированном центре, коррекция ВААРТ, лечение токсоплазмоза.

**Лекарственно-индуцированные экстрапирамидные нарушения**

Прием нейролептиков, даже атипичных – распространенная причина лекарственного паркинсонизма у больных СПИД. Так, по данным Hriso et al., у больных СПИД экстрапирамидный синдром наблюдался в 3,4 раза чаще при лечении галоперидолом и в 2,4 раза чаще при приеме других нейролептиков по сравнению с ВИЧ-отрицательными пациентами [23]. Считается, что повышенная восприимчивость пациентов с ВИЧ-инфекцией к блокаторам дофаминовых рецепторов обусловлена прямым инфекционным поражением базальных ганглиев [24] или может быть результатом предшествующей субклинической дегенерации черной субстанции [7].

Значительно реже при приеме нейролептиков встречаются дистонии или пароксизмальные дискинезии. Имеются сообщения о появлении фокальных дистоний у ВИЧ-инфицированных пациентов с паркинсонизмом на фоне проводимой ВААРТ и симптоматической терапией леводопой.

Появление постурального тремора отмечено у больных со СПИД при лечении пневмоцистной пневмонии триметоприм-сульфаметоксазолом [2].

В литературе имеются сообщения о развитии экстрапирамидных симптомов при одновременном приеме ритонавира и бупропиона [25], а также о возможности индинавира усиливать действие леводопы [26]. Этот эффект авторы связывают с влиянием ингибиторов протеазы на цитохром P450 и блокированием метаболизма некоторых лекарственных препаратов в печени.

Таким образом, у пациентов с ВИЧ-инфекцией может наблюдаться большое разнообразие экстрапирамидных нарушений, при этом феноменология отдельного двигательного расстройства не является строго специфичной для поражения вирусом иммунодефицита. Идентификация причины этих расстройств имеет существенный потенциал для уменьшения или стабилизации неврологических симптомов после лечения основного заболевания.

### Литература

1. Евзельман М.А., Снимщикова И.А., Королева Л.Я., Камчатнов П.Р. Неврологические осложнения ВИЧ-инфекции. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2015; 3: 89-93.
2. Borucki M.J., Matzke D.S., Pollard R.B. Tremor induced by trimethoprim-sulfamethoxazole in patients with acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Ann. Intern. Med.* 1988; 109: 77-78.
3. Britton C.B., Miller J.R. Neurologic complications in acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Neurol. Clin.* 1984; 2: 315-339.
4. Nath A., Jankovic J., Pettigrew L.C. Movement disorders and AIDS. *Neurology.* 1987; 37: 37-41.
5. De Mattos J.P., Rosso A.L., Correa R.B. et al. Involuntary movements and AIDS: report of seven cases and review of the literature. *Arq. Neuropsiquiatr.* 1993; 51: 491-497.
6. Berger J.R., Moskowitz L., Fischl M., Kelley R.E. The neurological complications of AIDS: frequently the initial manifestation. *Neurology.* 1984; 34 (Suppl. 1): 134-135.
7. Mirsattari S.M., Power C, Nath A. Parkinsonism with HIV infection. *Mov. Disord.* 1998; 13: 684-689.
8. Martinez-Martin P. Hemichorea-hemiballism in AIDS. *Mov. Disord.* 1990; 5: 180.
9. Navia B.A., Jordan B.D., Price R.W. The AIDS dementia complex: clinical features. *Ann. Neurol.* 1986; 19: 517-524.
10. Arendt G., Hefter H., Hilperath F. et al. Motor analysis predicts progression in HIV-associated brain disease. *J. Neurol. Sci.* 1994; 123: 180-185.
11. Zuma de Rosso A.L., Pitágoras de Mattos J., Correa R.B. et al. Parkinsonism and AIDS: A clinical comparative study before and after HAART. *Arq. Neuropsiquiatr.* 2009; 67: 827-830.
12. Tanaka M., Endo K., Suzuki T. et al. Parkinsonism in HIV encephalopathy. *Mov. Disord.* 2000; 15:1032-3.
13. Arendt G., Hefter H., Elsing C. et al. Motor dysfunction in HIV-infected patients without clinically detectable central nervous deficit. *J. Neurol.* 1990; 237: 362-368.
14. Aylward E., Henderer J., McArthur J.C. et al. Reduced basal ganglia volume in HIV-1 associated dementia: results from quantitative neuroimaging. *Neurology.* 1993; 43: 2099-2104.
15. Dal Pan G., McArthur J.H., Aylward E., et al. Patterns of cerebral atrophy in HIV-1 infected individuals: results of a quantitative MRI analysis. *Neurology.* 1992; 42: 2125-2130.
16. Trenkwalder C., Straube A., Paulus W. et al. Postural imbalance: an early sign in HIV-1 infected patients. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 1992; 241: 267-272.
17. Hersh B.P., Rajendran P.R., Battinelli D. Parkinsonism as the presenting manifestation of HIV infection: Improvement on HAART. *Neurology.* 2001; 56: 278-279.
18. Martinez-Martin P., Gonzalez L.J., Perea M. et al. Hyperkinetic syndrome as initial manifestation of AIDS. *Neurologia.* 1986; 1: 129-132.
19. Reyes-Iglesias Y., Grant T.H. Hemiballism-hemichorea: unusual neurologic presentation in acquired immunodeficiency syndrome. *Bol. Assoc. Med. P. R.* 1991; 83: 17-18.
20. Tse W., Cersosimo M.G., Gracias J.M. et al. Movement disorders and AIDS: a review. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2004; 323-334.
21. Koppel B.S., Daws M. Rubral tremor due to midbrain toxoplasmosis abscess. *Mov. Disord.* 1980; 5: 254-256.
22. De Mattos J.P., Zuma de Rosso A.L., Correa R.B., Novis S.A. Movement disorders in 28 HIV-infected patients. *Arq. Neuropsiquiatr.* 2002; 60: 525-530.
23. Hriso E., Kuhn T., Masdeu J., Grundman M. Extrapyrmidal symptoms due to dopamine-blocking agents in patients with AIDS encephalopathy. *Am. J. Psychiatry.* 1991; 148: 1558-1561.
24. Factor S.A., Podskalny G.D., Barron K.D. Persistent neuroleptic-induced rigidity and dystonia in AIDS dementia complex: a clinicopathological case report. *J. Neurol. Sci.* 1994; 127: 114-120.
25. Clay P.G., Adams M.M. Pseudo-Parkinson disease secondary to ritonavir-buspirone interaction. *Ann. Pharmacother.* 2003; 37: 202-205.
26. Caparros-Lefebvre D., Lannunzel A., Tiberghien F., et al. Protease inhibitors enhance levodopa effects in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 1999; 14: 535.

## Современные подходы, используемые для изучения болезней двигательного нейрона

К.Р. Валетдинова<sup>1,2,3,4</sup>, Е.И. Устьянцева<sup>1,2,3,4</sup>, Е.В. Григорьева<sup>1,2,3,4</sup>, М.А. Маретина<sup>5,6</sup>, М.Л. Куранова<sup>7</sup>, А.В. Киселев<sup>5</sup>, В.С. Баранов, Е.Д. Сорокоумов<sup>1,8</sup>, А.С. Ратушняк<sup>8</sup>, Е.А. Кизилова<sup>1</sup>, Ю.М. Минина<sup>1</sup>, А.С. Ветчинова, С.П. Медведев<sup>1,2,3,4</sup>, С.М. Закиян<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН»;

<sup>2</sup>ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН»;

<sup>3</sup>ФГБУ «СФБМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина»;

<sup>4</sup>ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» (Новосибирск);

<sup>5</sup>ФГБНУ «НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта»;

<sup>6</sup>ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»;

<sup>7</sup>ФГБНУ «Институт цитологии РАН» (Санкт-Петербург);

<sup>8</sup>ФГБУН «Институт вычислительных технологий СО РАН» (Новосибирск);

<sup>9</sup>ФГБНУ «Научный центр неврологии» (Москва)

### Введение

Болезни двигательного нейрона (БДН) объединяют генетически и клинически гетерогенную группу заболеваний, которые сопровождаются прогрессирующей дегенерацией двигательных нейронов головного и/или спинного мозга, приводящей к параличу поперечнополосатой мускулатуры. Особое место среди БДН занимают боковой амиотрофический склероз (БАС) и спинальная мышечная атрофия (СМА).

БАС – орфанное заболевание, частота которого в разных популяциях составляет от 1–2 до 4–6 случаев на 100000 человек в год [1]. На долю спорадической формы БАС приходится порядка 90% всех случаев этого заболевания. Около 10% случаев классифицируют как наследственную или семейную форму БАС. К наиболее распространенным генетическим причинам данного заболевания относится экспансия гексануклеотидных повторов GGGGCC в гене *C9ORF72*, а также мутации в генах *SOD1*, *TDP-43*, *FUS*, *OPTN*, *VCP* и др.[1]. Мутации в гене *SOD1* наиболее многочисленны (свыше 180) [2] и приводят к развитию нескольких форм БАС, отличающихся большим разнообразием затрагиваемых клеточных процессов, симптомов и возрастом начала их проявления, а также пенетрантностью и тяжестью течения заболевания.

СМА относится к числу самых частых моногенных нейродегенеративных заболеваний. Наиболее часто встречающейся формой СМА является проксимальная СМА I–IV типов [3]. При этом наиболее тяжелыми являются I и II тип, развивающиеся в раннем детском возрасте [4]. В среднем 1 из 6000–10000 детей рождается со СМА, при этом около 50% больных детей не доживают до двух лет [5]. Причиной этого заболевания являются мутации в гене *SMN1* [6]. Около 95% мутаций составляют гомозиготные делеции, в остальных случаях встречаются точечные мутации в гомозиготном состоянии, или в компаунде с делециями [7]. Основным модифицирующим фактором при СМА, оказывающим влияние на степень проявления и скорость развития симптомов, является количество копий паралогичного гена *SMN2* [8]. Чем больше копий *SMN2*, тем мягче течение заболевания.

Помимо схожих патологических проявлений на молекулярном и клеточном уровне [9], общим для БАС и СМА является то, что для этих заболеваний нет эффективного лечения, а существующие на сегодняшний момент терапевтические подходы лишь замедляют прогрессию и выраженность симптомов, и рассматриваются скорее как поддерживающие. Предприняты попытки изучения патогенеза БАС и СМА на биологических моделях, однако их недостатком является несоответствие клинических проявлений заболевания у пациентов и у модельных животных. Поэтому важнейшей задачей является получение адекватных модельных систем для изучения БДН, включающих релевантный тип клеток – двигательные нейроны человека.

Значительный прогресс в создании клеточных моделей БДН человека и их комплексном изучении связан с развитием нижеследующих новых подходов в молекулярной генетике и клеточной биологии.

1. Разработка метода перепрограммирования соматических клеток к плюрипотентному состоянию; пациент-специфичные индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) могут неограниченное время сохранять свои свойства в культуре и давать в результате дифференцировки необходимые клеточные производные [10].

2. Разработка систем направленного редактирования генов, которые позволяют производить практически любые модификации нуклеотидной последовательности, такие как нокаут генов, внесение/исправление однонуклеотидных замен и более крупных мутаций, добавление флуоресцентных меток, создание хромосомных перестроек [11].

Основные этапы создания клеточной модели включают: получение культуры соматических клеток больного, перепрограммирование соматических клеток к плюрипотентному состоянию, получение линий ИПСК, характеристика данных линий, направленная дифференцировка ИПСК в релевантный тип клеток. Двигательные нейроны, дифференцированные из ИПСК и воспроизводящие фенотип БДН, могут быть использованы в исследованиях этиопатогенеза БАС и СМА, а также в фармакологических и токсикологических исследованиях. Одним из основных преимуществ пациент-специфичной модели является воспроизведение генотипа больного конкретной формой заболевания. Кроме того, двигательные нейроны могут быть получены в любом необходимом для проведения исследований количестве и качестве. А поскольку ИПСК пациента можно дифференцировать в любой тип клеток и тканей, то открывается возможность оценивать вклад других клеточных типов в развитие БАС и СМА, что уже было показано для сенсорных нейронов и астроцитов [12–15].

С помощью систем направленного редактирования генов можно осуществлять широкий спектр научных задач: получать новые клеточные модели БДН; создавать изогенные пары, состоящие из интактных клеток и клеток с исправленной мутаций; проводить коррекцию мутаций, являющихся причинами развития БАС и СМА; создавать трансгенные линии, имеющие репортерные гены и позволяющие метить конкретные типы клеток (двигательные нейроны или их предшественники, клетки глии), а также отдельные клеточные компоненты, белки.

В данной работе перечисленные выше современные подходы реализуются в двух направлениях: создание и исследование пациент-специфичной модели БАС; получение и характеристика пациент-специфичной модели СМА и разработка системы коррекции мутации в гене *SMN2*.

### Получение пациент-специфичной модели БАС

Для перепрограммирования к плюрипотентному состоянию использовались мононуклеары пациента с наследственной формой БАС, имеющего мутацию Асп90Ала в гене *SOD1*. Преимущество использования мононуклеаров перед фибробластами состоит в том, что эти клетки проходят меньше делений в организме, соответственно, накапливают меньше изменений в геноме. Это особенно актуально для БАС, поскольку данное заболевание развивается в зрелом и старческом возрасте. Кроме того, забор материала (венозная кровь) в случае использования мононуклеаров проще, чем при получении фибробластов (биопсия кожи).

Для перепрограммирования к плюрипотентному состоянию были использованы эписомные векторы, обеспечивающих временную экспрессию транскрипционных факторов *OCT4*, *KLF4*, *I-MYC*, *SOX2*, *LIN28*. Данный способ был выбран потому, что он является одним из методов перепрограммирования без интеграции трансгенов в геном, поскольку эписомы элиминируются из клеток при длительном культивировании. Кроме того, часть линий ИПСК была получена в условиях «xeno-free», то есть в условиях культивирования без использования продуктов животного происхождения и клеток чужеродного происхождения. Культивирование в подобных условиях является важным шагом на пути к использованию клеточных технологий в регенеративной медицине.

В результате эксперимента по перепрограммированию мононуклеарных клеток крови от пациента с наследственной формой БАС было получено 13 линий ИПСК (таблица 1). Клетки всех полученных линий имели большое ядерно-цитоплазматическое соотношение, интенсивно пролиферировали, росли однослойными плоскими колониями, схожими по морфологии с эмбриональными стволовыми клетками (ЭСК) человека, и экспрессировали эндогенную щелочную фосфатазу (рисунок 1).

В результате эксперимента по перепрограммированию фибробластов от пациента со СМА I типа было получено двадцать девять линий ИПСК. В результате репрограммирования фибробластов от пациента со СМА II типа и от условно здорового человека было получено двадцать пять и семнадцать линий ИПСК, соответственно (таблица 1).

Изучен и оценен статус плюрипотентности клеточных линий, полученных в результате перепрограммирования фибробластов, в системе *in vitro*. С помощью набора тестов доказано, что полученные культуры являются плюрипотентными стволовыми клетками и имеют соответствующую морфологию, характерный профиль экспрессии генов, участвующих в поддержании самообновления и плюрипотентности, нормальный кариотип, а также несут мутации, характерные для пациентов с СМА (рисунок 2).

Доказано, что спектр дифференцированных производных, полученных в результате спонтанной дифференцировки ИПСК, представлен производными трех зародышевых листков – экто-, эндо- и мезодермы (рисунок 3). Причем эти данные получены как при спонтанной дифференцировке в системе *in vitro*, так и в тесте на дифференцировку *in vivo* – формирование тератом у иммунодефицитных мышей. Тератомный тест является своего рода «золотым стандартом» для подтверждения плюрипотентности стволовых клеток человека, поскольку другие тесты в системе *in vivo*, в частности, получение первичных химер, невозможны по причинам этического порядка.

Важнейшим этапом работы стала дифференцировка полученных клеточных культур в двигательные нейроны, поскольку именно эти клетки гибнут при СМА (рисунок 4). Дифференцировка включала три стадии: нейроэпителиальные предшественники, предшественники двигательных нейронов и непосредственно двигательные нейроны (незрелые и зрелые) [16]. Данные стадии воспроизводят основные этапы развития двигательных нейронов в онтогенезе человека. Тем самым открываются широкие перспективы для исследования спинальной мышечной атрофии в процессе развития.

Таблица 1. Клеточные модели БДН на основе индуцированных плюрипотентных клеток человека, полученные в данной работе.

Заболевание	Мутация	Источник	Условия культивирования, необходимые для поддержания плюрипотентности	Количество линий ИПСК	Обозначение
СМА I типа	гомозиготная делеция в гене <i>SMN1</i>	фибробласты	эмбриональные фибробласты мыши	29	iSMAN <sup>o</sup>
СМА II типа	гомозиготная делеция в гене <i>SMN1</i>	фибробласты	эмбриональные фибробласты мыши	25	m3SMAN <sup>o</sup>
Норма	-	фибробласты	эмбриональные фибробласты мыши	17	m34SkN <sup>o</sup>
БАС	миссенс-мутация Асп90Ала в гене <i>SOD1</i>	мононуклеары	эмбриональные фибробласты мыши	11	N <sup>o</sup> M-iALS
			«xeno-free»	2	N <sup>o</sup> g-iALS



На стадии нейроэпителиальных предшественников показана экспрессия основного маркера данного типа клеток – транскрипционного фактора SOX1, а также PAX6 (рисунок 4). На стадии предшественников двигательных нейронов клетки демонстрировали экспрессию OLIG2 – основного маркера данного клеточного типа. В участках формирования синапсов показана экспрессия белка SYNI. Через 3 недели дифференцировки нейроны демонстрировали экспрессию транскрипционных факторов HB9 и ISL1, что позволяет сделать вывод о принадлежности данного типа нервных клеток к двигательным нейронам (рисунок 4). Кроме того, была показана экспрессия белков цитоскелета двигательных нейронов – NF200, TUJ1, MAP2. По завершению заключительного этапа дифференцировки была показана экспрессия CHAT – маркера зрелых двигательных нейронов (рисунок 4).

Электрофизиологическая активность зрелых двигательных нейронов, прошедших более 30 дней дифференцировки и экспрессирующих маркеры ISL1 и CHAT, была проанализирована методом «патч-кламп».

Показано, что деполяризующий стимул в 10 пА длительностью 500 мс вызывал потенциал действия в нейронах линии m3SMA13, но не контрольной линии m34Sk10 (рисунок 4Б, верхний ряд). В то же время деполяризующий стимул в 60 пА вызывал пачечные разряды потенциала действия разной частоты в клетках обеих линий. Гиперполяризация стимулом в -10 пА не сопровождалась видимой реакцией клеток обеих линий. Нейроны линии m3SMA13 демонстрировали более выраженную спонтанную активность и были более деполяризованы в покое, чем нейроны контрольной линии m34Sk10 (рисунок 4Б, нижний ряд).

Таким образом, в ходе данной работы с достаточно большой эффективностью были получены двигательные нейроны больных SMA I, II типа и здорового человека, которые представляют собой уникальную модельную систему для изучения этого заболевания.

### Разработка системы коррекции мутации в гене SMN2

Современные перспективные методы терапии SMA, которые допущены до проведения доклинических и клинических испытаний в США и странах Западной Европы, – антисенс-олигонуклеотиды, способствующие увеличению продукции полноразмерного транскрипта с центромерной копии гена *SMN1*, а также малые молекулы, обеспечивающие неспецифические, как правило, нейротрофические эффекты. Большинство из них имеют низкую эффективность при лечении наиболее тяжелой формы спинальной мышечной атрофии I типа, на долю которой приходится около 50% всех пациентов с данным заболеванием. Кроме того, даже в случае успешного прохождения клинических испытаний, для достижения длительного положительного результата необходимы постоянные инъекции таких препаратов пациентам [17]. Единственный генотерапевтический подход, предполагающий доставку аденоассоциированных вирусов с дополнительной копией гена *SMN1*, находится на 1-й стадии клинических испытаний и еще не доказал свою эффективность и безопасность. Поэтому актуальной задачей является разработка и тестирование новых молекулярно-генетических подходов для коррекции мутаций при SMA.

Одним из перспективных подходов является использование системы CRISPR/Cas9 для коррекции однонуклеотидной замены в гене *SMN2*. Последовательности генов *SMN1* и *SMN2* различаются лишь пятью нуклеотидами [8]. Ген *SMN1* экспрессирует полноразмерный транскрипт, с которого считывается белок, способный к образованию функциональных комплексов, состоящих из нескольких субъединиц SMN. В случае гена *SMN2* от 80% до 90% мРНК не имеют в своем составе седьмого экзона в результате нарушения сплайсинга, вызванного заменой цитозина на тимин (*SMN2* с.850C>T) [7]. Способность гена *SMN2* производить небольшое количество полноразмерных транскриптов (около 10–15%) делает его основным геном-модификатором SMA. Было показано, что число копий гена *SMN2* коррелирует с тяжестью SMA [18]. Большинство пациентов со SMA I типа имеют одну или две копии гена *SMN2*, пациенты со SMA II типа имеют три копии гена *SMN2*, больные SMA III типа имеют три или четыре копии *SMN2*. Соответственно, в результате коррекции мутации с.850C>T в гене *SMN2* даже в гетерозиготном положении следует ожидать увеличение уровня полноразмерного транскрипта SMN и смягчение фенотипа SMA – как в случае гомозиготной делеции *SMN1*, так и в более редких случаях. Клеточная модельная система SMA, полученная в данной работе, является удобным объектом для тестирования и оценки эффектов использования CRISPR/Cas9-опосредованной коррекции мутации в гене *SMN2*. В ходе дифференцировки ИПСК проходят несколько стадий от нейроэпителиальных предшественников до предшественников двигательных нейронов и зрелых двигательных нейронов, которые воспроизводят основные стадии развития данного типа нервных клеток в онтогенезе человека. Таким образом, можно моделировать и оценивать эффекты коррекции мутаций в разных типах клеток, то есть на разных стадиях развития заболевания.

### Заключение

В представленной работе получены новые модельные системы БДН человека, состоящие из пациент-специфичных клеток больных SMA I и II типа и здорового человека, а также ИПСК пациента с наследственной формой БАС, имеющего миссенс-мутацию Asp90Ala в гене *SOD1*. Полученные линии ИПСК успешно прошли тесты на плюрипотентность, включая тератомный тест – практически единственный способ проверки плюрипотентности стволовых клеток человека в условиях *in vivo*. Для получения двигательных нейронов из ИПСК был использован наиболее современный подход, предполагающий эффективную направленную дифференцировку в зрелые постмитотические двигательные нейроны с помощью комбинации малых молекул и ингибитора сигнального пути NOTCH – Compound E.

Полученная модельная система послужит основой для исследования особенностей данного заболевания на молекулярном и клеточном уровнях, а также для разработки высокоэффективных и безопасных методов исправления мутаций, вызывающих SMA. Немаловажным преимуществом такой модели является возможность изучения ранних стадий развития

заболевания в процессе дифференцировки предшественников в зрелые двигательные нейроны. В таком формате также возможно оптимизировать поиск соединений, препятствующих развитию СМА или замедляющих прогрессию данного заболевания на начальном этапе, когда еще не наступила массовая гибель нейронов.

*Исследование поддержано грантом РФФИ № 16-04-01662.*

### Литература

1. Taylor J.P., Brown R.H., Cleveland D.W. Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature*. 2016; 539(7628): 197-206.
2. Abel O., Powell J.F., Andersen P.M., Al-Chalabi A. ALSod: A user-friendly online bioinformatics tool for amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Hum. Mutat.* 2012; 33: 1345-1351.
3. Munsat T.L., Davies K.E. International SMA consortium meeting (26-28 June 1992, Bonn, Germany). *Neuromuscul. Disord.* 1992; 2 (5-6): 423-428.
4. Finkel R.S., McDermott M.P., Kaufmann P. et al. Observational study of spinal muscular atrophy type I and implications for clinical trials. *Neurology*. 2014; 83: 810-817.
5. Prior T.W., Snyder P.J., Rink B.D. et al. Newborn and carrier screening for spinal muscular atrophy. *Am. J. Med. Genet.* 2010; 152A (7): 1608-1616.
6. Lefebvre S., Burglen L., Reboullet S. et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*. 1995; 80: 155-165.
7. Parsons D.W., McAndrew P.E., Monani U.R. et al. An 11 base pair duplication in exon 6 of the SMN gene produces a type I spinal muscular atrophy (SMA) phenotype: further evidence for SMN as the primary SMA-determining gene. *Hum. Mol. Genet* 1996; 5: 1727-1732.
8. Monani U.R., Lorson C.L., Parsons D.W. et al. A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum. Mol. Genet.* 1999; 8: 1177-1183.
9. Gama-Carvalho M., Besse F., Weis J. et al. Linking amyotrophic lateral sclerosis and spinal muscular atrophy through RNA-transcriptome homeostasis: a genomics perspective. *J. Neurochem.* 2017; 141: 12-30.
10. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126: 663-676.
11. Nemudryi A.A., Valetdinova K.R., Medvedev S.P., Zakian S.M. TALEN and CRISPR/Cas Genome Editing Systems: Tools of Discovery. *Acta Naturae*. 2014; 6 (3): 19-40.
12. Schwab A.J., Ebert A.D. Sensory neurons do not induce motor neuron loss in a human stem cell model of spinal muscular atrophy. *PLoS One*. 2014; 9(7): e103112.
13. Rindt H., Feng Z., Mazzasette C. et al. Astrocytes influence the severity of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 2015; 24: 4094-4102.
14. Serio A., Bilican B., Barmada S.J. et al. Astrocyte pathology and the absence of non-cell autonomy in an induced pluripotent stem cell model of TDP-43 proteinopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2013; 110: 4697-4702.
15. Taiana M., Sassone J., Lauria G. Mutant SOD1 accumulation in sensory neurons does not associate with endoplasmic reticulum stress features: Implications for differential vulnerability of sensory and motor neurons to SOD1 toxicity. *Neurosci. Lett.* 2016; 627: 107-114.
16. Du Z.W., Chen H., Liu H. et al. Generation and expansion of highly pure motor neuron progenitors from human pluripotent stem cells. *Nat. Commun.* 2015; 6: 6626.
17. Bishop K.M., Montes J., Finkel R.S. Motor milestone assessment of infants with spinal muscular atrophy using the hammersmith infant neurological Exam-Part 2: Experience from a nusinersen clinical study. *Muscle Nerve*. 2017.
18. McAndrew P.E., Parsons D.W., Simard L.R. et al. Identification of proximal spinal muscular atrophy carriers and patients by analysis of SMNT and SMNC gene copy number. *Am. J. Hum. Genet.* 1997; 60: 1411-1422.

## Повреждение перивентрикулярного белого вещества мозга как модель детского церебрального паралича

*А.В. Ставровская, Д.Н. Воронков, А.С. Гущина, Н.Г. Ямицкова, А.С. Ольшанский*

*Научный центр неврологии (Москва)*

Повреждение перивентрикулярного белого вещества (ПВБВ) у недоношенных детей является одной из основных причин детского церебрального паралича (ДЦП). Несмотря на значительные улучшения в неонатальном уходе, до сих пор нет специфичного лечения перинатальных повреждений мозга. Проблема поиска препаратов с доказанной безопасностью для детей, которые легко преодолевают гематоэнцефалический барьер и имеют потенциальные нейропротекторные свойства, весьма актуальна. Для ее решения создаются различные модели ДЦП на животных. Успешная модель для тестирования экспериментальных методов лечения должна совмещать характерное и воспроизводимое поражение с сенсомоторным дефицитом, который может каким-то образом отражать поведенческую инвалидность, наблюдаемую при церебральном параличе. Предшествующие зачатию, пренатальные и перинатальные факторы, вовлеченные в патофизиологию повреждений мозга, приводящих к ДЦП, включают в себя гипоксию-ишемию, эндокринную нестабильность, наследственные факторы, дефицит фактора роста, избыток продукции свободных радикалов кислорода, материнскую инфекцию, при которой вырабатывается избыток цитокинов и другие про-воспалительные агенты [1, 2, 6].

В основе молекулярного механизма, характерного для некоторых из этих факторов риска, лежит избыточное высвобождением глутамата. Соответственно, инъекция глутаматного агониста в стриатум, новую кору мозга или перивентрикулярное белое вещество новорожденных грызунов вызывает гистологические повреждения, которые имитируют ДЦП-ассоциированное повреждение мозга. Оно характеризуется расстройством нейрональной миграции, полимикроглией, кистозной перивентрикулярной лейкомаляцией и гипоксии-ишемическими или ишемия-подобными корковыми и стриатными повреждениями [7, 11].

Использование специфичных агонистов для различных классов глутаматергических рецепторов показало, что активация микроглии играет значимую роль в повреждениях перивентрикулярного белого вещества, вызванных агонистами, действующими на рецепторы N-метил-D-аспартата (NMDA) [16]. Повреждения мозга, вызванные у новорожденных мышей глутаматергическим агонистом иботенатом (действующим на NMDA и метаботропные рецепторы), имитируют некоторые аспекты кист белого вещества и транскортикального некроза, наблюдаемого при перинатальном повреждении головного мозга у человека [15].

Кроме того, что перивентрикулярные инъекции эксайтотоксического агента иботеновой кислоты (ИБК) у грызунов являются причиной повреждений, которые гистологически схожи с наблюдаемыми у человека при повреждении ПВБВ, они также вызывают дефицит кортикоспинальных функций, которые могут служить моделью ДЦП у человека [2, 6, 10, 12–14].

### Материалы и методы

Для получения модели ДЦП крысам 5-го постнатального дня (день рождения считается нулевым) проводили стереотаксические операции по введению ИБК. При проведении операций крысята были анестезированы сочетанным введением домитора («Orion Pharma», Finland) в дозе 100 мг/кг и «Золетила 50» («Virbac Sante Animale», Франция) в дозе 5 мг/кг [5].

Скальп крысят надрезали и через промежутки между несросшимися фронтальными и парietальными костями черепа билатерально вводили 1 мкл раствора (2,5 мкг ИБК в 1 мкл физ. раствора либо только 1 мкл физ. раствора). Введение осуществляли с помощью 2 мкл микрошприца фирмы Hamilton, специализированного для нейроинъекций. Иглу шприца помещали на 2 мм ниже пиальной поверхности, на 1 мм латеральнее средней линии с помощью двойного лабораторного стереотаксиса (Stoelting, USA). Мишенями для повреждения были аксонные тракты мозолистого тела (corpus callosum) в области между сенсомоторной корой (передние лапы) и стриатумом. Каждая инъекция осуществлялась в течении 1 мин, затем игла оставалась на месте в течении 5 мин, прежде чем медленно извлекалась из мозга. Разрез на скальпе зашивали хирургическими нитями размера 0.

По окончании стереотаксической операции и наложения швов животному вводили антиседан («Orion Pharma», Finland) в дозе 2,5 мг/кг. Для предупреждения переохлаждения животного все манипуляции проводились на подогреваемых поверхностях, после операции животные помещались в подогреваемый контейнер на теплую подстилку. Через 2–4 ч крысята возвращались в домашнюю клетку матери.

Выживаемость крысят составила 95%. По достижению экспериментальными животными 28-го постнатального дня, из них были сформированы следующие группы для проведения исследования:

- 1) контроль интактный – группа крыс обоего пола без какого-либо фармакологического или хирургического вмешательства, которая находилась в аналогичных опыту условиях (n=16, 10 самцов (m) и 6 самок (f));
- 2) ложно-оперированные крысы – группа крыс обоего пола, которым на 5-й постнатальный день была проведена стереотаксическая операция с введением физ. раствора в ПВБВ (n=10, 6m и 4f);
- 3) опытная группа (далее «ИБК») – группа крыс обоего пола, которым на 5-ый постнатальный день была проведена стереотаксическая операция с введением ИБК в ПВБВ (n=9, 5m и 4f);

В послеоперационном периоде проводился ежедневный мониторинг состояния крысят и матери. Во время клинического осмотра проводилось определение габитуса, оценки состояния кожи и видимых слизистых оболочек. Во всех группах состоя-

ние животных на момент осмотра было удовлетворительным. Животные были распределены по группам рандомизированно.

**Тестирование поведения.** Для оценки степени полученных неврологических нарушений проводили следующие поведенческие тесты: «открытое поле» (ОП), «сужающаяся дорожка» (СД) и пищедобывательный тест (ПДТ). Тестирование в ОП и на СД проводили дважды за время эксперимента, на 34-й и 55-й постнатальный день. Пищедобывательный тест проводили 4 раза, с интервалом 1 неделя между тестами.

Установка для изучения изменения двигательной активности и ориентировочно-исследовательского поведения, «ОП», представляла собой квадратный короб, со стороной 75 см, высотой стенок 40 см, пол которого был разделен на 25 равных квадратов. В течение 3 мин. осуществлялся подсчет количества пересеченных квадратов, а также фиксирование поведения с помощью системы видео наблюдения за поведением животных Any-maze.

Установка СД имела стандартную конструкцию [4]. Экспериментальное животное должно было пройти по верхней планке от начала дорожки до укрытия. Подсчитывалось число оступаний передними и задними конечностями при проходе по всей длине дорожки. Для тестирования крыс 34 постнатальной длина СД составляла 120 см. При тестировании на 55-й постнатальный день использовали дорожку длиной 150 см.

Пищедобывательный тест, проводимый с целью выявления дефицита когнитивных и двигательных функций, рассчитан на способность экспериментального животного достичь передней конечностью пищевой паллеты (1 зерно воздушного риса), извлечь ее, удержать и затем употребить. Установка для проведения данного теста подробно описана в работе [17]. Экспериментальное животное, подвергшееся предварительной 6 часовой пищевой депривации, помещалось в установку, где проходило тестирование. Попытка извлечения рисового зерна считалась успешной, если животное передней конечностью достигало его, захватывало и переносило внутрь установки, где и употребляло. Отрицательным результатом считалась попытка, при которой животное либо слизывало рис языком, либо не могло дотянуться до пищевого подкрепления, либо стягивало его без захвата лапой, либо роняло на пол. Очередная порция пищевого подкрепления поступала на полку тогда, когда животное находилось у противоположной от полки стены. Тестирование продолжалось 20 мин, эффективность выполнения теста подсчитывалась в процентах положительных попыток от общего количества подходов к полке.

Полученные в результате поведенческих экспериментов данные обрабатывали в программе Statistica 12.0, используя однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ . Данные представлены в виде групповых средних и стандартной ошибки.

По окончании экспериментов животных усыпляли хлороформом, затем декапитировали и извлекали мозг с целью проведения на следующем этапе работы планируемых иммуногистохимических исследований.

**Забор и подготовка материала для гистологического исследования.** Для проведения патоморфологического и иммуногистохимического исследования мозг извлекали и фиксировали 24 часа в 4% формалине приготовленном на фосфатном солевом буфере (pH=7,2), после чего промывали водой, дегидратировали последовательно проводя через растворы этанола возрастающей концентрации (40, 60, 80, 96%) и абсолютизированный изопропанол (99,9%), и пропитывали парафином Histoplast 2 часа при температуре 56°C. Серийные фронтальные парафиновые срезы толщиной 12 мкм готовили на санном микротоме Leica SR2000 и каждый третий срез помещали на покрытые желатином стекла. Для исследования отбирали срезы на уровнях от +2.1 до -2.1 мм от Bregma, в соответствии с атласом мозга крысы G.Paxinos.

**Методы гистологического и иммуногистохимического окрашивания.** Нейроны коры и белое вещества мозга исследовали на срезах, окрашенных методом Ниссля и методом Клувер–Баррера. Белое вещество выявляли окрашиванием в 0,05% спиртовом растворе люксолевого синего (4 часа при 54°C) с дифференцировкой в 1% растворе карбоната лития). Люксолевый синий служит специфическим красителем для выявления миелинизированных волокон в ЦНС. По методу Ниссля срезы окрашивали в 0,1% растворе крезилового фиолетового на ацетатном буфере (pH=4,5).

Изменения основных глиальных популяций исследовали иммуногистохимическими и лектинохимическими методами.

**Микроглию выявляли** по связыванию с лектином IB4 (растительный лектин лианы *Griffonia simplicifolia*, GSL-IB4), имеющего высокую аффинность к  $\alpha$  d галактозильным остаткам гликопротеинов, для которого показано связывание с тирозинкиназным RET рецептором к семейству глиальных нейротрофических факторов GDNF [8]. Биотинилированный лектин IB4 (Sigma-Aldrich) в концентрации 10 мкг/мл на ТРИС-НCl буфере (pH=7,4), содержавшем 1 mM MgCl<sub>2</sub> и 1 mM CaCl<sub>2</sub>, наносили на срезы и инкубировали 18 ч при температуре 4°C, после чего промывали и выявляли связывание лектина пероксидазным методом, используя экстравидинпероксидазу (Sigma-Aldrich, инкубация 2 часа, в разведении 1:100) и хромоген 3,3-диаминобензидин с усилением солями никеля и кобальта (Sigma-Aldrich, набор Sigma-Fast). Срезы закрывали под покровное стекло в среду DPX Surgipath.

**Фиброзные астроциты и олигодендроглию** белого вещества выявляли, используя двойную метку на кислый глиофибрилярный белок (GFAP) и глутаминсинтетазу (GS, фермент глутамин-глутаматного цикла, локализованный как в астроцитах, так и в олигодендроглии). Астроциты выявляли по наличию GFAP, служащего классическим астроцитарным маркером.

Перед проведением иммуногистохимических реакций срезы подвергали процедуре тепловой демаскировки антигена (нагревание в микроволновой печи, 600 W, 85–90°C, 10 мин. в 0,01 M цитратном буфере pH=6,0). Для исследования использовали мышинные моноклональные антитела к GFAP (Sigma-Aldrich, в разведении 1:150) и кроличьи антитела (Sigma-Aldrich, 1:500) к глутаминсинтетазе. Срезы инкубировали с растворами антител на 0,1M фосфатном солевом буфере, содержавшем 0,1% Triton X100, 18 часов при комнатной температуре. Визуализацию связывания проводили иммунофлуоресцентным методом с помощью соответствующих вторичных антител (Sigma-Aldrich, 1:200): козьих иммуноглобулинов, выработанных к антителам кролика, меченых флуорохромом CF488 и иммуноглобулинов ослы против мышинных антител (флуорохром CF555). После инкубации со вторичными антителами ядра клеток докрашивали DAPI (диаминофенилин-



дол). Срезы заключали под покровное стекло в среду FluoroShield, снижающую «выгорание» флуоресцентной метки.

Помимо этого, для выполнения двойного иммуногистохимического окрашивания на GFAP и GS при исследовании препаратов в светлом поле, использовали полимерную систему детекции Thermo Fisher LabVision основанную на двойной ферментной метке — пероксидазной (для выявления связывания мышинных антител) и щелочной фосфатазы (для кроличьих антител); окрашивание проводили в соответствии с протоколом производителя реактивов, срезы заключали в среду на водной основе, обеспечивающую сохранность цветного продукта реакции щелочной фосфатазы.

Для всех методов иммуногистохимических исследований в каждой серии препаратов проводили негативный контроль окрашивания (без первичных антител) и позитивный контроль (препараты мозга животных с известным характером глиальной реакции).

Препараты исследовали и документировали, используя светлопольный микроскоп Leica DMLB, оснащенный цифровой камерой Leica DC300 и флуоресцентный микроскоп Nikon Eclipse NiU, с соответствующим набором фильтров (FITC, Cy3, DAPI) и цифровой камерой Nikon DS-Qi1.

**Методы количественной оценки гистологических препаратов.** Для оценки размеров структур, количества клеток и использовали программы для морфометрии Leica Qwin и Nikon NIS Elements.

**Относительные размеры желудочков мозга и мозолистого тела** оценивали для каждого животного на фронтальных срезах мозга, взятых с трех уровней (9–15 срезов с животного), аналогично ранее описанному методу [9]. Измерения проводили используя стереомикроскоп Motic SMZ с цифровой камерой Moticom 5 (5 Мпкс) на препаратах, окрашенных методом Клувер–Баррера, что позволяло дифференцировать белое и серое вещество мозга. При фиксированном увеличении микроскопа (объектив  $\times 0,65$ ) контур среза мозга, границы мозолистого тела и боковых желудочков обводили вручную при помощи графического планшета Wacom на «живом» изображении, выводимом на монитор и вычисляли площади структур. Статистически оценивали изменения относительных показателей – отношение площади мозолистого тела и отношение площади желудочков мозга на срезе к общей площади среза мозга.

**Подсчет нейронов** производили на препаратах, окрашенных по методу Ниссля в пятом слое сенсомоторной коры. Подсчитывали клетки в поле зрения камеры микроскопа при увеличении объектива  $\times 40$ , удовлетворяющие условию центрального сечения [3] – с выявляемым ядрышком в ядре. Поля зрения в пределах изучаемого слоя сенсомоторной коры выбирали на удалении от глиального рубца, вызванного введением иглы при операции. По морфологии различали мелкие и средние нейроны пятого слоя и крупные пирамидные нейроны и подсчитывали отдельно крупные пирамидные нейроны и все остальные нейроны. Для анализа отбирали не менее 6 полей зрения с 5 уровней для каждого мозга (от 30 до 50 полей зрения на животное). Полученные данные проверяли на нормальность распределения и усредняли.

**Подсчет астроцитов и олигодендроглии** проводили под флуоресцентным микроскопом, используя двойную метку. К астроцитам относили клетки с ветвистыми отростками содержащие GFAP и, как правило, имеющие высокую экспрессию глутаминсинтетазы (GFAP+/GS+). К олигодендроглии относили негативные при окрашивании на GFAP клетки овоидной формы, содержащие глутаминсинтазу и не имеющие протяженных выявляемых отростков (GFAP-/GS+). Использованный метод дает возможность надежно дифференцировать олигодендроглию по нейрохимическим и морфологическим признакам (рис. 1).

Совместную локализацию исследуемых белков в клетке проверяли на совмещенных изображениях, полученных с разных фильтров (FITC и Cy3). Подсчитывали лишь клетки, имевшие сохранные, четко различимые при окрашивании на DAPI ядра. Подсчет выполняли на «живом» изображении, на поле зрения микроскопа (увеличение объектива  $\times 40$ ), на всю толщину среза. Для анализа отбирали не менее 6 полей зрения с 5 уровней с каждого мозга (30–50 полей зрения на животное). Поля зрения выбирали в области введения токсина и прилегающей к ней зоне, но на удалении от выраженного глиального рубца (рис. 2). Данные полученные с каждого мозга проверяли на нормальность распределения и усредняли.

**Статистическую обработку** полученных данных проводили в программе StatSoft Statistica 6.0. Рассчитывали медиану и интерквартильный размах, а также среднее и стандартную ошибку среднего для каждой группы. Статистическую обработку проводили для следующих групп животных: «Control» – ложно-оперированные, «ИБК» – введение иботеновой кислоты. Для оценки статистических различий выполняли дисперсионный анализ ANOVA и апостериорный тест Fisher LSD. С учетом поправки Бонферрони на множественные сравнения при проверке различий между экспериментальными группами (число сравнений  $m=4$ ), уровень значимости  $p = 0,0125$ . Данные представлены в виде групповых средних и стандартной ошибки, точки – индивидуальные средние значения по каждому животному.

## Результаты

### Пищедобывательный тест

Исследование поведения экспериментальных животных в пищедобывательном тесте показало, что интактные животные выполняли тест с высоким процентом положительных реакций, который оставался практически неизменным на протяжении всех четырех тестов. Ложно-оперированные животные показали в первом тесте меньший процент положительных реакций, чем интактные, а у крыс группы «ИБК» процент положительных реакций был крайне мал (рис. 3). В последующих тестах у животных группы «ИБК» наблюдался рост процента правильных реакций, который носил достоверный характер, начиная с третьего теста.

Однако, процент положительных реакций у крыс группы «ИБК» оказался значительно ниже по сравнению с этим же показателем у интактных и ложно-оперированных животных. Достоверные различия между этими показателями сохранялись во всех четырех тестах (рис. 4). Таким образом, повреждение ПВБВ иботеновой кислотой привело к выраженному ухудшению выполнения экспериментальными животными пищедобывательного теста.

### Тест «сужающаяся дорожка»

Тестирование экспериментальных животных на установке «СД» проводили дважды, на 33-й и 55-й постнатальный день. При сравнении результатов 1-го и 2-го тестов было показано, что количество оступаний передними конечностями у интактных и ложно-оперированных крыс было очень незначительным и практически не различалось между тестами, а в группе «ИБК» количество оступаний во 2-м тесте значительно превысило их число в 1-м (рис. 5А). Количество оступаний задними конечностями в первом тесте у животных всех групп превышало количество оступаний передними. При повторном тестировании на 55-й постнатальный день число таких оступаний в первых двух группах резко уменьшилось, а в группе «ИБК» практически не изменилось (рис. 5Б). В группах «интактные» и «ложно-оперированные» эти изменения были достоверными.

Кроме того, число оступаний задними конечностями у группы «ИБК» в обоих тестах достоверно превышало этот показатель у группы интактных и ложно-оперированных крыс (рис. 6). Таким образом, введение иботеновой кислоты привело к нарушению координации движения модельных крыс, которое сохранялось, по крайней мере, на протяжении всего времени исследования.

### Тест «открытое поле»

Тестирование двигательной активности в «ОП» проводилось за время исследования дважды, на 28-й постнатальный день и после последнего ПДТ. У каждой группы изменение величины двигательной активности выявлялось при сравнении между тестами. При подсчете числа пересеченных квадратов, было показано, что достоверного изменения их числа не было в группе интактных животных, а у животных групп «ИБК» и ложно-оперированных крыс отмечалось достоверное снижение величины этого параметра (рис. 7).

Фиксирование и анализ двигательной активности экспериментальных крыс с помощью программы «Apu-maze» показало, что изменение величины пройденной дистанции имело тот же характер, что и изменение числа пересеченных квадратов (рис. 8), хотя при измерении пройденной дистанции учитывалось и движение животного внутри квадратов (топтанье, вращения и т.п.).

Подобный характер изменений наблюдался при анализе перемещений в центральной зоне «ОП». Однако, следует отметить, что снижение пройденного пути в центральной зоне у ложно-оперированных животных и группы «ИБК» было более выраженным, чем снижение общего пройденного пути (рис. 9 Б, В).

### Общая патоморфологическая характеристика изменений сенсомоторной коры и мозолистого тела, вызываемых введением ИБК

Область введения иглы у всех экспериментальных животных обнаруживалась билатерально, симметрично, на заданном уровне. Трек иглы был окружен глиальным рубцом и вокруг него наблюдалось снижение плотности нейронов как в группе ложно-оперированных животных, так и во всех группах, получавших ИБК. В связи с этим патоморфологические изменения исследовали на расстоянии от поврежденной введением иглы ткани.

Наиболее характерными изменениями сенсомоторной коры головного мозга животных, получавших ИБК, были: смещение слоев коры, изменение распределения нейронов слоя V и его истончение (рис. 10, 11). В слое V сенсомоторной коры мозга животных, получавших ИБК, часто обнаруживались гиперхромные пирамидные нейроны, у ложно-оперированных животных этих изменений не наблюдали.

Окрашивание методом Клувер–Баррера на миелиновые волокна не выявило выраженного снижения окрашивания мозолистого тела, однако толщина мозолистого тела у животных, получавших ИБК, как правило, была меньше, чем в группе интактного контроля и ложно-оперированных животных. Следует отметить, что резкое уменьшение толщины мозолистого тела не было наиболее характерным признаком у животных получавших ИБК. Чаще, в белом веществе у животных, получавших ИБК, наблюдали формирование многочисленных мелких кист, которые отмечали, в том числе, у животных с неизменной толщиной мозолистого тела (рис. 11).

Следующим характерным признаком, наблюдавшимся в той или иной степени у всех животных после введения ИБК, было увеличение размеров боковых желудочков, по сравнению с группой интактного контроля и ложно-оперированными животными. Следует отметить, что степень увеличения желудочков значительно варьировала между разными животными, в ряде случаев наблюдали асимметричное расширение желудочков, что приводило к смещению структур мозга (рис. 12). При сопоставлении групп ложно-оперированных и интактных животных также отмечали увеличение желудочков, однако эти изменения были выражены в меньшей степени.

Таким образом, основными общими патоморфологическими изменениями, выявляемыми рутинными гистологическими методами, в группах животных, получавших ИБК, были: расширение боковых желудочков, образование мелких кист в белом веществе, смещение слоев коры и повреждение нейронов пятого слоя. Выраженность этих изменений значительно варьировалась между животными.

### Оценка размеров боковых желудочков, мозолистого тела и плотности нейронов слоя V сенсомоторной коры мозга

Измерения размеров структур показали, что общая площадь мозга на срезах не менялась, что ранее также было продемонстрировано аналогичным методом на модели введения ИБК в работе Chen и соавт. [9], в связи с этим данные по площади структур представлены в процентах от площади мозга на срезе. Как выявило проведенное морфометрическое исследование, относительные размеры боковых желудочков мозга в группе животных, получавших ИБК, увеличивались в равной мере от-

носителем группы ложно-оперированного контроля (рис. 13). Проведенный однофакторный дисперсионный анализ выявил статистически значимые различия между группами ( $F [4; 20] = 4,08; p < 0,05$ ). Апостериорный тест Фишера с поправкой Бонферрони выявил значимые отличия от контроля средних размеров боковых желудочков в группе, получавшей ИБК.

Средние размеры мозолистого тела (площадь мозолистого тела в процентах от площади мозга на срезе) значимо снижались по сравнению с ложно-оперированным контролем в экспериментальной группе, получавшей ИБК (рис. 14). Однофакторный дисперсионный анализ выявил статистически значимые различия между группами ( $F [4; 20] = 3,87; p < 0,05$ ). Апостериорный тест Фишера показал значимое снижение размеров мозолистого тела в группе животных, получавших ИБК, относительно контроля. Анализ показал большую вариабельность площади мозолистого тела между экспериментальными животными, по сравнению с размерами желудочков мозга.

Плотность распределения нейронов слоя V сенсомоторной коры экспериментальных животных рассчитывали по числу нейронов в поле зрения микроскопа. Для пирамидных нейронов средних и мелких размеров статистически значимых изменений плотности распределения выявлено не было ( $F [4; 20] = 2,2; p > 0,05$ ), что может быть связано с обнаруженной высокой индивидуальной вариабельностью этого показателя в модельной группе животных. Анализ плотности распределения крупных пирамидных нейронов слоя V выявил статистически значимые различия между группами ( $F [4; 20] = 7,17; p < 0,001$ ) (рис. 15).

Таким образом, введение ИБК приводило к статистически значимому уменьшению мозолистого тела и увеличению желудочков мозга, а также вызывало нейродегенеративные изменения в сенсомоторной коре и снижение плотности распределения нейронов V слоя коры, что согласуется с данными литературы [9].

#### **Реакция глиальных популяций перивентрикулярного белого вещества и сенсомоторной коры мозга экспериментальных животных**

Помимо описанных выше изменений, введение ИБК по данным литературы характеризуется выраженным влиянием на глиальные популяции мозга [9], в связи с этим нами была проведена оценка морфологических и иммуногистохимических изменений микроглии, астроцитов и олигодендроглии у экспериментальных животных.

*Реакция микроглии.* У животных в области введения ИБК выявляли усиление окрашивания лектином IB4, выявляющим микроглию. При этом, у ложно-оперированных животных активация микроглии выявлялась лишь непосредственно по ходу трека иглы и была заметно слабее (рис. 16).

Микроглия мозолистого тела у контрольных и ложно-оперированных животных характеризовалась тонкими отростками и была рассеяна среди других глиальных клеток белого вещества, тогда как у животных, получавших ИБК, отмечали формирование в перивентрикулярном белом веществе очагов активированной микроглии с утолщенными ветвящимися отростками (рис. 17). При этом выявляемая активация микроглии была выражена в разной степени у разных животных. Кроме того, у животных, получавших ИБК, отмечали образование обширных очагов активированной глии не только у мозолистом теле, но и в коре головного мозга (рис. 18).

Выявленная активация микроглии может опосредовать повреждение и пролонгированную гибель нейронов при введении ИБК.

*Изменения астро- и олигодендроглиоцитов.* Используемые нами антитела к GFAP показали преимущественное связывание с фиброзными астроцитами белого вещества у интактных животных. У животных подвергнутых стереотаксической операции, включая группу ложно-оперированных, наблюдалось образование глиального рубца с интенсивной GFAP-позитивной реакцией по ходу введения иглы. При этом гипертрофия астроглии в перивентрикулярном белом веществе в группе животных, получавших только ИБК, была наиболее выражена (рис. 19). В отдельных случаях, наблюдавшихся в экспериментальной группе, получавшей ИБК, отмечали резкое усиление экспрессии GFAP в подкорковых структурах и на всем протяжении мозолистого тела (рис. 20).

В группе, получавшей ИБК, выявлялась наибольшая экспрессия GFAP в мозолистом теле и перивентрикулярном белом веществе. Олигодендроглиоциты в группе ИБК не имели выраженных морфологических особенностей, однако формировали более короткие цепочки (рис. 21).

Дисперсионный анализ выявил значимые различия экспериментальных групп по плотности астроцитов ( $F [4; 19] = 20,75; p < 0,001$ ) и олигодендроглии ( $F [4; 19] = 4,41; p < 0,01$ ). Сравнение групп показало значимое увеличение плотности GFAP-позитивной астроглии в группе, получавшей ИБК (рис. 22). Для олигодендроглии была выявлена обратная зависимость — статистически значимое снижение плотности GS-позитивных овоидных клеток в группе ИБК по сравнению с контролем (рис. 23).

Таким образом, введение ИБК приводило к более выраженной активации микро- и астроглии и увеличению экспрессии GFAP в перивентрикулярном веществе по сравнению с ложно-оперированными животными, а также к снижению плотности олигодендроглии, экспрессирующей GS.

#### **Обсуждение**

Данные, полученные в результате комплексного тестирования, позволили оценить степень нарушений поведения у экспериментальных животных.

Так, исследование поведения в ПДТ показало, что интактные животные выполняли тест с высоким процентом положительных реакций. Они в течение короткого периода времени исследовали установку, быстро находили место, где находилось рисовое зерно, уверенно захватывали его передней конечностью и без труда переносили его внутрь камеры, где и употребляли. Такое поведение сохранялось во всех 4 тестах. Ложно-оперированные животные демонстрировали схожие

показатели, достоверных различий при сравнении с группой интактных животных не отмечалось. Введение ИБК в ПВБВ приводило к выраженным нарушениям поведения. Выполнение ПДТ вызывало у таких животных большие затруднения, особенно при первом тестировании. У крыс было снижено ориентировочно-исследовательское поведение, они мало перемещались по установке, в течение продолжительного времени не могли найти место расположения полки с пищевым подкреплением, затруднялись в оценке местоположения зерна, делали неоднократные безуспешные попытки нащупать его, не могли захватить и удержать передней конечностью, роняли рис с полки. Достоверные различия между этой группой и интактными животными, а также ложно оперированными, сохранялись во всех 4 тестах. Следует отметить, что при повторении тестов у животных происходил процесс обучения, они легче ориентировались и повышали моторный навык добычи пищи. Этим объясняется некоторое увеличение числа положительных попыток при выполнении ПДТ.

При тестировании двигательных нарушений у крыс в установке «СД» было показано, что количество оступаний передними конечностями у интактных и ложно-оперированных крыс было минимальным как при первом, так и при втором тестировании. Количество оступаний у модельных животных было значительно выше уже при первом тестировании, достоверно большим, чем у интактных крыс, а ко второму тестированию превысило показатели первых двух групп в 5 раз. Анализ количества оступаний задними конечностями показал, что у интактных и ложно-оперированных животных количество оступаний стало значительно меньше во 2-м тесте. Это, возможно, объясняется развитием координации и увеличением двигательных навыков у животных при взрослении. Введение иботеновой кислоты в ПВБВ привело к нарушению координированных движений, количество оступаний задними конечностями было достоверно большим, чем у интактных и ложно оперированных животных как при первом, так, особенно, при втором тестировании. Таким образом, тестирование экспериментальных животных на установке «СД» показало, введение ИБК в ПВБВ привело к устойчивому нарушению координации движений модельных крыс. В большей степени эти нарушения касались движений передними конечностями.

Изменение двигательной активности в «ОП» выявлялось при сравнении первого и второго теста. Было показано, что величина пройденного пути, выраженная числом пересеченных квадратов, а также общей дистанции и дистанции, пройденной в центральном квадрате (в метрах) у интактных животных практически не изменялась. Интересно, что изменения двигательной активности в «открытом поле» у модельных и ложно-оперированных крыс были практически идентичными. У крыс этих групп величина общего пройденного пути при втором тестировании оказалась достоверно ниже, чем при первом. При этом величина дистанции, пройденной в центральном квадрате при втором тестировании, оказалась резко сниженной, т.е. животные больше перемещались по периметру установки. Это может свидетельствовать о некотором ухудшении эмоционального состояния данных животных по сравнению с интактными. Следует также отметить, что, хотя величина пройденной дистанции уменьшалась, она не достигала уровня, свидетельствующего о гипокинезии.

Известно, что в данной работе мишенями для повреждения ИБК были аксонные тракты мозолистого тела (*corpus callosum*) в области между сенсомоторной корой (передние лапы) и стриатумом. Полученные данные свидетельствуют о наличии такого повреждения у модельных животных. В результате тестирования были выявлены нарушения движений передних конечностей, а также снижение когнитивных функций у животных с введением ИБК в ПВБВ. Тестирование в ОП показало, что повреждение сенсомоторной коры без токсического воздействия также приводит к некоторым изменениям поведения, которые требуют дополнительных исследований.

### Заключение

Проведенное исследование показало, что введение ИБК в ПВБВ крысам в 5-й постнатальный день приводило к 33-ю дню постнатального развития к выраженным изменениям поведения, нарушениям движения, особенно передних конечностей, и дефициту когнитивных функций. Морфологическое исследование обнаруживало у экспериментальных животных стойкие изменения в ЦНС — повреждение мозолистого тела, увеличение объема желудочков мозга и нарушения организации сенсомоторной коры и глио-нейрональных взаимодействий. Выявленные изменения позволяют заключить, что используемая модель обнаруживает поведенческие и нейроморфологические признаки, имеющие определенное сходство с симптомами, наблюдаемыми при ДЦП.



**Литература**

1. Болезни нервной системы. Руководство для врачей: в 2-х т. М.: Медицина, 2001.
2. Иллариошкин С.Н. ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование. М.: МИА, 2004.
3. Миронов А.М., Безнусенко Г.В., Сесорова И.С., Банин В.В. Как измерять структуры или новая стереология. Морфология. 2006; 3: 72-75.
4. Силачѐв Д.Н., Шубина М.И., Янкаускас С.С. и др. Оценка сенсомоторного дефицита в отдаленном периоде после ишемии/гипоксии головного мозга неонатальных крыс Журн. высш. нервн. деят. 2013; 3: 405-416.
5. Ставровская А.В., Гущина А.С., Ямщикова Ольшанский А.С. Особенности моделирования раннего органического поражения головного мозга у крысят 5-го постнатального дня. В сб.: Фундаментальные и прикладные проблемы нейронаук: функциональная асимметрия, нейропластичность нейродегенерация (под ред. М.А. Пирадова, С.Н. Иллариошкина, В.Ф. Фокина). М.: ДекАрт: 888-891.
6. Суслина З.А., Иллариошкин С.Н., Пирадов М.А. Неврология и нейронауки – прогноз развития. Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2007; 1: 5-9.
7. Acarin L., Gonzalez B. Primary cortical glial reaction versus secondary thalamic glial response in the excitotoxically injured young brain: astroglial response and metallothionein expression. Neuroscience. 1999; 92: 827-839.
8. Boscia F., Esposito C.L., Casamassa A. et al. The isolectin IB4 binds RET receptor tyrosine kinase in microglia. Neurochem. 2013; 126: 428-436.
9. Chen A., Dimambro N., Clowry G. A comparison of behavioural and histological outcomes of periventricular injection of ibotenic acid in neonatal rats at postnatal days 5 and 7. Brain Res. 2008; 1201: 187-195.
10. Fan L.W., Pang Y., Lin S. et al. Minocycline reduces lipopolysaccharide-induced neurological dysfunction and brain injury in the neonatal rat. J. Neurosci. Res. 2005; 82: 71-82.
11. Follett P.L., Rosenberg P.A., Volpe J.J., Jensen F.E. NBQX attenuates excitotoxic injury in developing white matter. J. Neurosci. 2000; 20: 9235-9241.
12. Hagberg H., Peebles D., Mallard C. Models of white matter injury: Comparison of infectious, hypoxic-ischemic, and excitotoxic insults. Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev. 2002; 8: 30-38.
13. Leroux P., Hennebert O., Legros H. et al. Role of tissue-plasminogen activator (t-PA) in a mouse model of neonatal white matter lesions: interactions with plasmin inhibitors and anti-inflammatory drugs. Neuroscience. 2007; 146: 670-678.
14. Marret S., Mukendi R., Gadisseux J.F. et al. Effect of ibotenate on brain development: an excitotoxic mouse model of microgyria and posthypoxic-like lesions. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 1995; 54: 358-370.
15. Sfaello I., Baud O., Arzimanoglou A., Gressens P. Topiramate prevents excitotoxic damage in the newborn rodent brain. Neurobiol. Dis. 2005; 20: 837-848.
16. Tahraoui, S.L., Marret, S., Bodenat, C. et al. Central role of microglia in neonatal excitotoxic lesions of the murine periventricular white matter. Brain Pathol. 2001; 11: 56-71.
17. Whishaw I.Q., Loss of the innate cortical engram for action patterns used in skilled reaching and the development of behavioral compensation following motor cortex lesions in the rat. Neuropharmacology. 2000; 39: 788-805.