

НАО «Западно-Казахстанский медицинский университет имени Марата
Оспанова»

УДК: 616.833-009.54-056.7:575.1(574)

На правах рукописи

УМУРЗАКОВА АЙНУР ОНТАЛАПОВНА

**Клинико-генетические характеристики миодистрофии Дюшенна
в Республике Казахстан**

6D110100 – Медицина

Диссертация на соискание степени
доктора философии (PhD)

Научные консультанты
PhD, асс. проф. Аяганов Д.Н.
д.м.н., проф. Нургалиева Р.Е.

Зарубежный консультант
MD, PhD, проф. М. Krawczynski
Польша

Республика Казахстан
Актобе, 2025

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ	3
ОПРЕДЕЛЕНИЯ	4
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	5
ВВЕДЕНИЕ	7
1 СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ВОПРОСА ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ МИОДИСТРОФИИ ДЮШЕННА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	12
1.1 Вопросы эпидемиологии миодистрофии Дюшенна. Общая характеристика гена DMD	12
1.2 Клинико-генетические характеристики миодистрофии Дюшенна	15
1.3 Молекулярно-генетические аспекты диагностики миодистрофии Дюшенна	18
1.4 Современные стратегии терапии миодистрофии Дюшенна	23
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	28
2.1 Общая характеристика исследования	28
2.2 Клинические методы исследования	30
2.3 Молекулярно-генетические методы исследования	32
2.4 Методы статистической обработки результатов исследования	34
3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	35
3.1 Частота встречаемости и наследования миодистрофии Дюшенна	35
3.2 Анализ спектра мутаций в гене <i>DMD</i>	37
3.3 Клиническая характеристика миодистрофии Дюшенна	44
3.3.1 Клиническая характеристика миодистрофии Дюшенна с учетом типа мутации	46
3.3.1.1 Оценка клинических характеристик детей с миодистрофией Дюшенна через 12 месяцев	52
3.3.2 Клиническая характеристика миодистрофии Дюшенна с учетом вида терапии	56
ОБСУЖДЕНИЕ	61
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	67
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	68
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	69
ПРИЛОЖЕНИЯ	83

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 7.32-2001. Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления (изменения от 2006 г.).

ГОСТ 7.1-2003. Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления Закон Республики Казахстан. О науке: принят 18 февраля 2011 года, №407-IV (с изменениями и дополнениями по состоянию на 01.01.2022 г.). Приказ Министра образования и науки Республики Казахстан. Об утверждении государственных общеобязательных стандартов образования всех уровней образования от 31 октября 2018 года №604 (зарегистрирован в Министерстве юстиции Республики Казахстан 1 ноября 2018 года, №17669).

ГОСТ 7.32-2017. (Межгосударственный стандарт). Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления.

ГОСТ 15.101-98. (Межгосударственный стандарт). Система разработки и постановки продукции на производство. Порядок выполнения научно-исследовательских работ.

ГОСТ 8.417-2002. Государственная система обеспечения единства измерений. Единицы величин.

ГОСТ 7.12-93. Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Библиографическая запись. Сокращение слов на русском языке. Общие требования и правила.

ГОСТ 7.54-88. Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Представление численных данных о свойствах веществ и материалов в научно-технических документах. Общие требования и правила.

Клинический протокол диагностики и лечения «Прогрессирующая мышечная дистрофия Дюшенна\Беккера» РЦРЗ (Республиканский центр развития здравоохранения МЗ РК). Клинические протоколы МЗ РК от 19 апреля 2019 года №63.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей диссертации применяют следующие термины с соответствующими определениями:

Лайонизация – инактивация одной из двух X-хромосом в женской соматической клетке на ранних стадиях развития, благодаря которой обеспечивается сбалансированность генетического материала у индивидов мужского и женского пола.

Мутация – это стойкое, внезапно возникшее изменение структуры наследственного материала на различных уровнях его организации, приводящее к изменению тех или иных признаков организма.

Гетерозиготное состояние мутации – одна гомологичная хромосома несет ген с мутацией, а другая – нормальный, неизмененный ген.

Гомозиготное состояние мутации – каждая из двух гомологичных хромосом несет данную мутацию.

Гемизиготное состояние мутации – генетический вариант, встречающийся только у мужчин, связанный с наличием мутации в единственной копии гена.

Аллель – один из пары генов, определяющих развитие того или иного признака; альтернативная форма одного и того же гена, привнесенного одним из родителей.

Праймеры – искусственно синтезированные олигонуклеотиды, служащие стартовой точкой копирования ДНК ферментом Taq полимеразой.

Доклиническая стадия Дюшенна – бессимптомная. Диагноз может быть заподозрен в случае определения повышенной активности креатинфосфокиназы (КФК) в крови, необъяснимого повышения уровня аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ) или наличия случаев заболевания в семейном анамнезе и установлен после проведения молекулярно-генетического исследования.

Ранняя амбулаторная стадия – сохранена способность к самостоятельному передвижению. Характерные симптомы: нарастающая мышечная слабость, быстрая утомляемость, частые падения, использование приема Говерса при подъеме из положений сидя и лежа, изменение походки по типу «утиной», хождение на носках, псевдогипертрофия мышц голеней.

Поздняя амбулаторная стадия – сохраняется способность к самостоятельному передвижению, но отмечается нарастание всех симптомов 2-й стадии.

Ранняя неамбулаторная стадия – утрачивается способность самостоятельно передвигаться, для передвижения требуются специальные средства, развивается сколиоз, сохраняется двигательная активность рук.

Поздняя неамбулаторная стадия – функции верхних конечностей ограничены, трудно удерживать положение тела, нарастают сердечная и дыхательная недостаточность.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АЛТ	Аланинаминотрансфераза
АСТ	Аспартатаминотрансфераза
АТФ	Аденозинтрифосфорная кислота
ГАМК	Гамма-аминомасляная кислота
ГКС	Глюкокортикостероиды
ДГК	Дистрофин-гликопротеиновый комплекс
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
ИВЛ	Искусственная вентиляция легких
КФК	Креатининфосфокиназа
ЛДГ	Лактатдегидрогеназа
МГК	Медико-генетическая консультация
МДБ	Миодистрофия Беккера
МДД	Миодистрофия Дюшенна
МЗ РК	Министерство здравоохранения республики Казахстан
НМЗ	Нервно-мышечное заболевание
ОГК	Органы грудной клетки
ПМСП	Первичная медико-санитарная помощь
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
РНК	Рибонуклеиновая кислота
РЦРЗ	Республиканский центр развития здравоохранения
РЦЭЗ	Республиканский центр электронного здравоохранения
СМА	Спинальная мышечная атрофия
ЦНС	Центральная нервная система
ЭДТА	Этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭКГ	Электрокардиограмма
ЭМГ	Электромиография
ЭНМГ	Электронейромиография
ЭхоКГ	Эхокардиография
A-AAV	Adeno-associated dependoparvovirus A Аденоассоциированный вирус
CGH	Comparative genomic hybridization Сравнительная геномная гибридизация
CINRG	Cooperative International Neuromuscular Research Group Международная кооперативная группа по нервно-мышечным исследованиям
CTGF	Connective tissue growth factor Фактор роста соединительной ткани
DMD	Ген дистрофина
FDA	Food and Drug Administration Управление по контролю за продуктами питания и лекарственными средствами
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2, Белок, связывающий рецептор роста 2

HDAC	Histone deacetylase Гистондеацетилазы
MLPA	Multiplex Ligation dependent Probe Amplification Мультиплексная лигированно-зависимая амплификация зонда
MRC	Medical Research Council Совет медицинских исследований
NCBI	National Center for Biotechnology Information Национальный центр биотехнологической информации
NGS	Next Generation Sequencing Секвенирование следующего поколения
nNOS	Nitricoxidesynthase Нейрональная синтаза оксида азота
NSAA	North Star Ambulatory Assessment Шкала «Северная Звезда»
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man Онлайн-каталог генов человека и генетических заболеваний
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences Компьютерная программа для статистической обработки данных
VAS	Visual Analogue Scale Визуальная аналоговая шкала
6MWT	6 Minute Walk Test 6 минутный тест ходьбы
ДИ	Доверительный интервал
ОР	Отношение риска
ОШ	Отношение шансов
РС	Рамка считывания генетического кода

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. В настоящее время проблема нервно-мышечных заболеваний является одной из актуальных задач современной медицины, что обусловлено тенденцией к увеличению их числа [1]. Вместе с тем, расширяются возможности диагностики наследственных заболеваний на основе современных высокотехнологичных методов молекулярной генетики, разрабатываются методы патогенетической и генной терапии [2]. Отдельного внимания заслуживают заболевания мышц, характеризующиеся прогрессирующей слабостью и дистрофией скелетных мышц [3]. Более распространенной формой таких состояний является прогрессирующая миодистрофия Дюшенна (МДД), которая регистрируется с частотой 1 случай на 3500/6000 новорожденных мальчиков [4,5]. Миодистрофия Дюшенна – тяжелое наследственное нервно-мышечное заболевание, характеризующееся Х-сцепленным рецессивным типом наследования и прогрессирующим течением, в основе которого лежат мутации гена, кодирующего белок дистрофин (*DMD*; локус Хр21.2) [6]. Основная функция дистрофина в мышцах – обеспечить саркомере механическую прочность [7]. Белок дистрофин также встречается в мышцах сердца и в незначительном количестве в головном мозге. Протяженность гена дистрофина составляет 2,2 миллиона пар нуклеотидов и содержит 79 экзонов, 78 интронов [8].

Заболевание поражает в основном мальчиков, приблизительно в 2/3 случаев сын получает хромосому с поврежденным геном от матери-носительницы, которая фенотипически здорова. В остальных случаях заболевание возникает в результате мутации *de novo* в половых клетках матери и отца [9].

На сегодняшний день основу терапии миодистрофии Дюшенна составляет только симптоматическое лечение. Поэтому актуальным является идентификация мутаций *DMD* гена, которая может помочь диагностировать заболевание и обеспечить точное генетическое консультирование и раннюю пренатальную диагностику пациентов с МДД. В последние 3-5 лет имеются и используются методы патогенетической терапии при данной патологии, для точного подбора которой необходимы новые знания о характерах изменений генного материала [10-15].

В настоящее время накоплены обширные данные в отношении делеционных спектров в различных популяциях мира, установлены определенные популяционные различия [16]. Изучение спектров мутаций в гене дистрофина, включая новые мутации, с точной локализацией мутации относительно экзона и их протяженность представляет собой уникальную возможность для выяснения механизмов на молекулярном уровне. Эффект влияния различных мутаций на трансляционную рамку считывания позволяет провести анализ корреляции клинических проявлений пациентов МДД и типа генетического изменения в гене дистрофина [3, р. 43].

Мутационная частота для гена дистрофина составляет 1 на 104 Х-хромосом, приблизительно 1/3 всех случаев МДД связана с мутациями *de novo*.

В связи с такими особенностями прямая ДНК-диагностика сталкивается с необходимостью выявления индивидуальных мутаций в каждой отдельной семье. Изучение новых точковых мутаций, в свою очередь, позволяет проводить более детальный функциональный анализ белка дистрофина аналогично анализу корреляции локализации мутации и клинических проявлений у пациентов с миодистрофией Дюшенна [3, р. 43]. Кроме того, обнаружение точковых мутаций позволяет расширить границы прямой диагностики изучаемой наследственной патологии.

По последним данным известно, что характер мутаций при МДД различен. Могут включать делеции, дубликации и точковые мутации. Разный характер мутаций, включая нонсенс-мутации, миссенс-мутации и мутации сайта сплайсинга встречаются в различных популяциях неравномерно. Применение инновационных методов терапии, как пропуск экзонов, и препарата для восстановления рамок считывания генетического кода, а также определение характера мутаций становятся необходимым и актуальным.

Анализ литературных источников показал, что в настоящее время актуальной и важной задачей является изучение особенностей клинических характеристик миодистрофии Дюшенна в свете применяемых таргетных форм лечения, основанное на определенных характеристиках мутации, что и явилось обоснованием проведения данного исследования. Изучение данной темы будет способствовать улучшению пониманий в области клинических и генетических характеристик миодистрофии Дюшенна.

Цель работы: на основе анализа типа мутаций в гене *DMD* изучить клинические особенности и влияние терапии на клиническое течение миодистрофии Дюшенна.

Задачи исследования

1. Изучить частоту встречаемости и наследования миодистрофии Дюшенна
2. Провести анализ спектра мутаций в гене *DMD* при миодистрофии Дюшенна.
3. Определить особенности клинического течения миодистрофии Дюшенна с учётом типа мутаций и терапии.

Научная новизна исследования

- впервые в Казахстане изучена частота встречаемости и наследования миодистрофии Дюшенна (носительство);
- проанализированы различные типы мутаций в гене *DMD* с оценкой их функциональной характеристики;
- на основе изучения спектра мутаций в гене *DMD* проведен корреляционный анализ «генотип-фенотип».

Теоретическая и практическая значимость

Результаты данной научной работы послужат основой в разработке Национального регистра и могут служить основанием для внесения дополнений в клинический протокол диагностики и лечения миодистрофии Дюшенна.

Результаты данной работы позволят врачам своевременно инициировать генетическую диагностику миодистрофии Дюшенна при случае повышения креатинфосфокиназы (КФК) в сыворотке крови у мальчиков с нарушением

походки первично методом MLPA, а при отрицательном результате – проводить секвенирование гена *DMD*.

Оценка состояния трансляционной рамки считывания генетического кода поможет прогнозировать прогрессирование заболевания, которое является ключевым критерием для своевременной инициации глюкокортикостероидной (ГКС) терапии.

Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс кафедры неврологии с курсом психиатрии и наркологии НАО «ЗКМУ им. Марата Оспанова», а также в практическое здравоохранение.

Основные положения, выносимые на защиту

1. В изученных регионах республики количество детей до 5 лет мужского пола согласно статистическим данным составило 350991; впервые диагностированы нами 106 случаев миодистрофии Дюшенна, что соответствует частоте как 1 случай на 3311 мальчиков. В 64,4% случаев больные мальчики мутацию в гене *DMD* унаследовали от матерей, тогда как в 35,6% случаев – мутация была спонтанной (*de novo*).

2. При анализе типа мутаций в гене *DMD* превалировал делеционный спектр (59,3%; 95%ДИ: 51,9-68,9), чем дупликации и точечные мутации, при котором протяженные делеции составили 81,5% (95%ДИ: 77,4-86,1). Обнаруженные мутации преимущественно располагались в высокофункциональном актинсвязывающем участке гена *DMD* (60,4%; 95%ДИ: 51,5-70,1), которые представлены всеми типами мутаций, тогда как в центральном участке – преимущественно делециями, в участке, ответственного за присоединение дистрофин-гликопротеинового комплекса – точечными ($p=0,015$). Нарушение трансляционной рамки считывания отмечался в 82,4% (95%ДИ: 72,3-92,1) случаев и преимущественно располагались в актинсвязывающем (76,4%; 95%ДИ: 66,5-85,9) участке гена *DMD*.

3. Состояние рамки считывания влияло на клинические характеристики: при нарушении отмечался ранний дебют заболевания ($2,95 \pm 0,25$ лет), низкий балл $15 \pm 5,6$ по NSAA, $292,4 \pm 11,3$ метров по 6MWT со снижением за 1 год до $285,8 \pm 3,12$. Для потери амбулаторности нарушение рамки считывания составил риск ОР 12,36 (95%ДИ: 2,51-22,18), при котором наблюдалась длительность самостоятельной ходьбы – $3,9 \pm 0,26$ лет.

У амбулаторных детей, принимающих ГКС терапию, за год показатели 6MWT улучшились с $317,4 \pm 12,57$ метров до $348,1 \pm 9,65$, тогда как у не принимающих с $319,8 \pm 13,07$ до $324,4 \pm 8,23$ метров. У неамбулаторных детей тест «подъем из положения лежа» за год удлинился с $12 \pm 2,45$ сек. до $17 \pm 2,18$ сек. и с $13 \pm 3,54$ сек. до $24 \pm 3,68$ сек., у принимающих и не принимающих ГКС терапию, соответственно. На фоне терапии препаратом Аталурен (Трансларна) показатель теста 6MWT улучшился с $327,4 \pm 2,57$ до $349,1 \pm 2,65$ метров за 12 месяцев.

Апробация работы. Результаты проведенного исследования доложены на:

1. IX международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы медицины» Баку, Азербайджан, 6-8 мая 2020 г. Доклад:

«Предварительные результаты клинико-генетического исследования миодистрофии Дюшенна в Западном регионе Казахстана».

2. Международной научно-практической конференции «XXIV Университетские неврологические чтения. «Неврология сегодня»» Уфа, Башкортостан, 29.10.-31.10.2020 г. Доклад: «Когнитивные нарушения у пациентов с миодистрофией Дюшенна».

3. LXI международной научной конференции молодых ученых «Наука: Вчера, Сегодня, Завтра» Актобе, Казахстан, 27.04.2022 г. Доклад: «Duchenne Muscular Dystrophy. Discription of clinical case».

4. Международной научно-практической конференции «Жас зерттеуші: заманауи педиатрия және балалар хирургиясының сын-тегеуріндері мен даму болашағы». Алматы, 2022 г. Доклад: «Қазақстанның Батыс аймағындағы Дюшенн миодистрофиясының клиникалық- генетикалық ерекшеліктері».

5. LXII международной научной конференции молодых ученых «Наука: Вчера, Сегодня, Завтра» Актобе, Казахстан, 27.04.2023 г. Доклад: «Патогенетическая терапия миодистрофии Дюшенна»

6. X Annual International Scientific-Practical Conference «Medicine Pressing Questions» and «Satellite Forum on Public Health and Health care Politics» Баку, Азербайджан, 27-28.04.2023 г. Доклад: «Клинические особенности миодистрофии Дюшенна в Западном регионе Казахстана».

Публикации по теме диссертации: по теме диссертации опубликовано 8 научных работ: 3 статьи в изданиях, индексируемых в информационной базе Scopus; 2 статьи в журналах, рекомендованных Комитетом по обеспечению качества в сфере науки и высшего образования Министерства образования и науки Республики Казахстан; 3 тезиса в сборниках международных конференций.

1. Umurzakova A, Ayaganov D, Mannapova A, Dzhumasheva B, Dzhaksybayeva A. Preliminary results of a genetic study of children with Duchenne myodystrophy in the Aktobe region. Achieves of Razi Institute 2023, Vol.78 No.3, p.949-954;

2. Ainur Umurzakova, Dinmukhamed Ayaganov, Roza Nurgalieva. Results of genetic study of children with Duchenne myodystrophy in Kazakhstan. Journal of Neurosciences in Rural Practice 2023, Vol. 14 Issue 2, p. 389-390;

3. Ainur Umurzakova, Dinmukhamed Ayaganov, Roza Nurgalieva, KamalzhanNadyrov, SarkytKozhantayeva, Gulnara Sakhipova, Aniya Seypenova, AkzhunusMannapova, Azat Chinaliyev, Ainur Donayeva. Revealing finding from genetic study of children affected by Duchenne myodystrophy in Kazakhstan. Bangladesh journal of medical science 2025 Vol. 24 No. 01, p. 279-284;

4. Umurzakova A., Ayaganov D. Clinical and genetic characteristics of Duchenne myodystrophy. «Астана медицина журналы» 2020 выпуск 4 (106), с. 82-87;

5. А.О. Умурзакова, Д.Н. Аяганов, М.Б. Джумагалиева. Роль мультидисциплинарной команды в ведении пациентов с прогрессирующей мышечной дистрофией Дюшенна. Журнал «Фармация Казахстана» 2022 выпуск 3(242), с.96-100.

6. D. Ayaganov, A. Umurzakova, A. Mannapova. Analysis of the spectrum of mutations in Duchenn's muscular dystrophy. Recent advances in rare disease. June 20-22.2019. Bogota. Colombia, p.59;

7. Umurzakova A.O, Ayaganov D.N., Jumagaliyeva M.B. Duchenne Muscular Dystrophy. Discription of clinical case. Сборник тезисов «LXII международная научная конференция молодых ученых «Наука: Вчера, Сегодня, Завтра»» 27.04.2022 г. Актобе, Казахстан, с. 47-48;

8. Умурзакова А.О., Аяганов Д.Н., Нургалиева Р.Е. Клинические особенности миодистрофии Дюшенна в Западном регионе Казахстана. Сборник тезисов «The IX Annual International Scientific – Practical Conference «Medicine Pressing Questions» 27-28 мая 2023 Баку, Азербайджан, с. 22-23.

Внедрение результатов исследования

Получены 3 акта внедрения в практическое здравоохранение и 1 акт внедрения в учебный процесс:

1. «Медико-генетическое консультирование пациентов с миодистрофией Дюшенна и их семей для оценки генетического риска повторения заболевания (генетический прогноз), определения способов диагностики и профилактики, объяснения смысла собранной и проанализированной медико-генетической информации» в условиях Центра планирования семьи и ПМСП города Актобе №134 от 06.04.2021 г. (Приложение А).

2. «Применение «теста 6MWT», «шкалы Vignos», «Времени для симптома Говерса» для функциональной оценки детей с миодистрофией Дюшенна в условиях ПМСП при первичном осмотре» №135 от 06.04.2021г. (Приложение Б).

3. Получен акт внедрения по учебно-методической работе: «Современные стратегии диагностики и лечения при нервно-мышечных заболеваниях». №1 от 29.10.2021 г. (Приложение В).

4. Оценка функций верхних и нижних конечностей при помощи шкал Brooke, P.J. Vignos у пациентов с прогрессирующей мышечной дистрофией Дюшенна для анализа уровня прогрессирования заболевания. № 265 от 03.11.2022. ГКП «Городская поликлиника №5» на ПХВ. (Приложение Г).

Личный вклад. Автором осуществлены выезды в 9 регионов Казахстана для набора материалов. Первичный осмотр, формирование выборки, заполнение индивидуальных регистрационных карт автором проведены лично. Усовершенствованы знания в области молекулярно-генетического анализа и научного менеджмента в рамках зарубежной научной стажировки. Автором проанализированы результаты генетических анализов и интерпретация прогнозирования патогенности по базам данных. Сформулированы основные положения и заключения.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 99 страницах с приложениями, состоит из 3 глав, заключения и выводов, практических рекомендаций, списка литературы, приложений, содержит 22 таблиц, 20 рисунка. Список использованных источников содержит 155 наименований на русском и английском языках.

1 СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ВОПРОСА ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ МИОДИСТРОФИИ ДЮШЕННА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Нервно-мышечные заболевания (НМЗ) наследственного характера составляют значительное место в структуре моногенных заболеваний и неврологической патологии. Многие НМЗ характеризуются тяжелым течением, приводящим к глубокой инвалидности и существенному сокращению продолжительности жизни. Это оказывает значительное влияние как на физическое и психическое здоровье пациентов, так и на их социальную интеграцию [4, р. 259]. НМЗ представляют собой широкий спектр заболеваний, отличающихся разнообразием причин, генетических особенностей и клинических проявлений, что затрудняет клиническую диагностику и медико-генетическое консультирование (МГК) [17]. Более частыми формами НМЗ являются спинальные мышечные атрофии (СМА) и миодистрофия Дюшенна (МДД). Во многих странах мира в настоящее время накоплены данные о широком распространении наследственной патологии, в том числе данные о частых формах НМЗ. В Казахстане сложно установить точную частоту встречаемости данных заболеваний из-за отсутствия официального регистра [18].

1.1 Вопросы эпидемиологии миодистрофии Дюшенна. Общая характеристика гена *DMD*

Мышечные дистрофии объединяют в себя группу наследственных заболеваний с различной степенью тяжести. Наиболее распространенным видом является миодистрофия Дюшенна (МДД, OMIM 310200) [4, р. 259]. Миодистрофия Дюшенна представляет собой редкое, генетически детерминированное нервно-мышечное расстройство, относящееся к классу дистрофинопатий и имеющее X-сцепленный рецессивный тип наследования.

Объединенные эпидемиологические оценки можно считать гораздо более надежными, чем оценки из отдельных исследований. Получение таких эпидемиологических данных о редких заболеваниях, таких как МДД, имеет основополагающее значение для оценки воздействия заболевания на население, с точки зрения бремени болезни, для выявления неудовлетворенных клинических потребностей и определения подходящих целевых групп населения для лекарств до их поступления на рынок. Последняя роль эпидемиологических исследований подчеркивается в случае МДД, поскольку в настоящее время все больше разработок патогенетических и генных видов терапии [19,20].

Из множества литературных источников по изучению распространенности МДД в странах Европы, Америки, Азии и Африки демонстрируют неоднородные показатели. Частота встречаемости МДД колеблется от 0,9 до 16,8 случаев на 100000 мужчин, включая популяцию новорожденных, а глобальная распространенность МДД варьировала от 0,7 до 7,7 случаев на 100000 человек [21]. Распространенность при рождении намного выше, чем распространенность у детей, потому что «дети с МДД могут не дожить до

детского возраста, и совокупная глобальная распространенность МДД снижается, как и ожидалось, до 2,8 случая на 100000, поскольку только мужчины могут быть затронуты этим заболеванием». Без географических критериев исключения общая глобальная распространенность МДД при рождении составляет 19,8 случая на 100000 (1 на 5000) живорожденных мальчиков. Согласно более поздним публикациям заболеваемость МДД колеблется от 1:3500 до 6800 новорожденных мальчиков [22]. Помимо кодирования заболеваний, еще одним распространенным инструментом идентификации МДД в исследованиях по эпидемиологии было генетическое тестирование, которое является наиболее надежным методом выявления пациентов с МДД [23]. Во многих странах на основе созданных регистров или базы данных можно говорить о конкретных цифрах. Средний показатель рождаемости колеблется от 15,9 до 19,5 на 100000 живорождений. Балльная распространенность на 100000 мужчин составила для Франции, США, Великобритании и Канады 10,9, 1,9, 2,2 и 6,1, соответственно [24]. Исследование взрослых пациентов с МДД во Франции показало, что средняя выживаемость для тех, кто родился в период с 1970 по 1994 годы, составляла 40,95 года по сравнению с 25,77 для тех, кто родился в период с 1955 по 1969 год. Различное бремя сопутствующей патологии и смертности при МДД и связанные с этим схемы обращения за медицинской помощью по сравнению с населением в целом подчеркивают важность детального изучения популяций с МДД. Ожидается, что «эпидемиология МДД будет в целом аналогичной во всем мире, поскольку не существует конкретной группы населения с известным более высоким риском» [25]. Однако различия могут возникнуть из-за различий возможностей диагностики в конкретных локациях.

Сбор эпидемиологических данных о МДД имеет основополагающее значение для поддержки принятия решений в области общественного здравоохранения, при распределении ресурсов с учетом высоких затрат на заболевание, связанных с потребностью в многопрофильной помощи, повышенное прямое и косвенное бремя пациентов и лиц, осуществляющих уход, и недавно доступные дорогостоящие методы лечения [26]. Общее качество эпидемиологических исследований МДД было относительно низким, что подчеркивает необходимость высококачественных исследований в этой области. Для лучшего понимания эпидемиологии МДД необходимы высококачественные исследования с более прозрачной отчетностью [27,28].

Несмотря на то, что миодистрофия Дюшенна относится к орфанным заболеваниям, за последние десятилетия количество выявляемых случаев имеет тенденцию к повышению. Возможно, связано и с улучшением диагностических возможностей. Частота встречаемости данного заболевания имеет широкий размах, 1 из 3500 или 6500 живорожденных мальчиков могут иметь это заболевание. По данным литературы эти показатели не сильно разнятся в разных странах. В Казахстане из-за отсутствия регистра пациентов точных цифр не имеем.

Существующий уровень диагностики и регистрации заболеваемости

миодистрофии Дюшенна не решает все вопросы сегодняшнего дня. Изучение данных о распространенности МДД с вопросами диагностики и лечения в Казахстане имеет приоритетное значение для развития неврологии, медицинской генетики практического здравоохранения.

Ген *DMD* локализован на X-хромосоме, чем и объясняется поражением мальчиков, тогда как женщины будут бессимптомными «здоровыми носителями» [25, р. 13]. Мужчина с пораженным аллелем на его единственной X-хромосоме является гемизиготным и не может передавать заболевание своим потомкам мужского пола, но все его дочери будут обязательными носителями. Здоровые гетерозиготные женщины-носители передают заболевание больным сыновьям [29]. Если у женщины-носителя есть дети от здорового мужчины, «вероятность поражения каждого потомства мужского пола составляет 50%, а у потомства женского пола 50%-ный шанс быть носителем» [30]. Если женщина, имеющая только одну X-хромосому (синдром Тернера), несет мутантный аллель, то будет иметь клинические проявления заболевания [31].

Данный ген имеет большую длину, поскольку состоит приблизительно из 2,2 миллиона пар нуклеотидов и содержит 79 экзонов. Являясь одним из наиболее крупных генов в геноме человека, *DMD* кодирует белок дистрофин, состоящий из 3685 аминокислотных остатков. Дистрофин выполняет критическую функцию в поддержании структурной целостности мышечных клеток и участвует в стабилизации сарколеммы, обеспечивая связь между актиновым цитоскелетом и внеклеточным матриксом. Экспрессия данного белка наиболее выражена в скелетной и сердечной мускулатуре, однако в небольших количествах дистрофин также обнаруживается в нейронах головного мозга [32]. Мутации в *DMD*, приводящие к дефектам или отсутствию дистрофина, вызывают дегенеративные процессы в мышцах и клинически манифестируют прогрессирующей мышечной слабостью и атрофией, характерными для миодистрофии Дюшенна.

С клонированием гена *DMD* и выявлением его белкового продукта – дистрофина сведения о генетических основах нервно-мышечных заболеваний значительно пополнились. Стало очевидным, что белок дистрофин располагается под сарколеммой и вместе с сарколеммальными белками, такими как дистрогликан, α -саркогликан и нейрональной синтазы оксида азота образует дистрофин-гликопротеинный комплекс (ДГК), который является важной структурной единицей гладких, сердечных и скелетных мышц. Дистрофин связывается с ДГК, взаимодействуя с ним через особый домен [33].

В гене *DMD* имеются, по крайней мере, семь промоторов и, по крайней мере, восемь изоформ дистрофина (Dp427 (m, p, c), Dp260, Dp140, Dp116, Dp71 и Dp40). Эти изоформы названы так, чтобы отражать их относительный размер, и они экспрессируются в разных типах тканей. Bladen et al. сообщили, что 68% пациентов имеют большую делецию, а 11% пациентов имеют большую дупликационную мутацию в гене *DMD* [34]. Авторы полагают, что существует горячая точка делеции в экзоне 45-55 и горячая точка дупликации в экзоне 2-22. Что касается изоформ дистрофина, экспрессируемых в головном мозге,

предполагается, что мутация на проксимальном конце (экзон 1–43) приведет к отсутствию только Dp427, тогда как более дистальные мутации (интрон 44–экзон 79) могут дополнительно влиять на Dp140 или Dp71/Dp40. Мутационные «горячие точки», а также делеции и дупликации приводят к тому, что примерно у половины пациентов с миодистрофией Дюшенна отсутствует только изоформа дистрофина Dp427, тогда как у другой половины отсутствуют и Dp427, и Dp140. Лишь у небольшого числа пациентов мутации затрагивают также изоформы Dp71 и Dp40 [35].

1.2 Клинико-генетические характеристики миодистрофии Дюшенна

Миодистрофия Дюшенна клинически манифестирует с мышечной слабости, связанной с прогрессирующей дегенерацией скелетных мышц, которые проявляются примерно в 2-5 лет, вызывая потерю возможности передвигаться первые 12 лет жизни, за которыми следуют сердечные осложнения и респираторные расстройства [36].

Этиологическим фактором данного заболевания выступают мутации в гене *DMD*, ответственного за кодирование белка дистрофина, играющего критическую роль в поддержании структурной целостности сарколеммы мышечных волокон. В результате данных мутаций происходит либо полное отсутствие дистрофина, либо синтез его дефектных форм, что приводит к дестабилизации мышечной мембраны и ускоренной дегенерации мышечных клеток. Морфофункциональные нарушения, связанные с дистрофином, инициируют каскад патологических изменений, включая утрату мышечных волокон, фиброз, а также их замену жировой тканью. Недостаток дистрофина, в свою очередь, нарушает структуру и функцию миофибрилл, которые необходимы для физиологического роста мышечной ткани [37].

Основная функция дистрофина в мышцах – соединить субсарколемный цитоскелет с сарколеммой путем присоединения N-конца к F-актину и C-конца к β -дистрогликану, и тем самым обеспечить сарколемме механическую прочность. Кроме участия в обеспечении механической стабильности сарколеммы, дистрофин также играет роль в сигнальной трансдукции, то есть в восприятии механической пертурбации, таких как сарколемное напряжение и превращение этого сигнала в биохимический ответ [38,39]. Несмотря на то, что дистрофин сам по себе не выполняет функции сигнальной молекулы, он играет ключевую роль в фиксации сигнальных белков на сарколемме, таких как нейрональная синтаза оксида азота (nNOS), белок, связывающий рецептор роста (Grb2) и другие компоненты сигнальных путей. В физиологических условиях нейрональная синтаза оксида азота локализуется на сарколемме благодаря взаимодействию с дистрофином и дистрофин-ассоциированным гликопротеиновым комплексом. Однако у пациентов, страдающих миодистрофией Дюшенна, отсутствие функционального дистрофина приводит к нарушению связывания nNOS с сарколеммой, что вызывает её делокализацию и потерю активности [40]. Это, в свою очередь, нарушает процесс регуляции кровотока и клеточных сигнальных путей, что усугубляет дегенеративные изменения в мышечных тканях и способствует прогрессированию патологии.

Разноречивые понятия имеются в отношении понимания четкой связи между размером и локализацией мутаций и тяжестью (прогрессированием) заболевания. Однако, у ученых есть основания предполагать, что если мутация прерывает трансляционную рамку считывания триплетов мРНК дистрофина, то будет синтезирован усеченный нефункционирующий С-концевой белок, что приведет к более тяжелой форме миодистрофии Дюшенна [41,42]. При этом мутация в гене дистрофина приведет к отсутствию дистрофина или его дефекту. Авторы заключают, что вследствие нестабильности саркоплазматических мембран нарушается функционирование ионных каналов. Это, в свою очередь, приводит к потере внутриклеточных компонентов, включая ионы кальция. Повышение концентрации свободного ионизированного кальция в цитоплазме мышечных волокон обладает некротизирующим действием, что ведет к гибели мышечных клеток и прогрессированию мышечной дистрофии [43]. В норме здоровые мышечные фибриллы регенерируют после повреждения, что наблюдается в течение первых 5 лет жизни больных миодистрофией Дюшенна. Однако при достижении этими пациентами подросткового возраста регенерации мышечной ткани не наблюдается [44]. Без дистрофина сарколемма становится хрупкой и неспособной противостоять напряжению нормального мышечного сокращения. В результате возникает воспаление, прогрессирующая мышечная дегенерация, некроз и замещение мышечной ткани. На клеточном уровне патологические изменения включают отсутствие дистрофина на мембранах мышечных волокон, увеличение объема жировой и соединительной ткани между мышечными волокнами, выраженным различием в размерах мышечных волокон, инфильтрацию воспалительными клетками и центральное расположение ядер, что указывает на дегенерацию и регенерацию мышечных волокон [45]. Различные фенотипические проявления при миодистрофии Дюшенна, в основном, связаны с типом мутации и эффектом на выработку дистрофина [46]. Прецизионное расположение гена *DMD* было определено с помощью техники G-окрашивания хромосом при изучении сбалансированных аутомсомных транслокаций у пациентов с миодистрофией Дюшенна [47]. Исследование делеционных вариантов гена дистрофина, с определением прецизионной локализации точек хромосомных разрывов, предоставляет принципиальную методологию идентификации молекулярных механизмов значительных генетических перестроек. Анализ пространственного расположения делеции относительно ключевых доменов дистрофинового белка и её воздействия на рамку трансляции позволяет выявить взаимосвязь между клиническими проявлениями миодистрофии Дюшенна и конкретными генетическими изменениями в исследуемом гене [48].

Поскольку мышечная дистрофия Дюшенна вызвана мутациями гена, ведущими к отсутствию белка дистрофина в поперечнополосатых мышцах, значительное количество которых связано с преждевременной остановкой кодонов, основным клиническим проявлением заболевания является мышечная слабость. Миодистрофия Дюшенна характеризуется прогрессирующим нарастанием мышечной слабости, снижением сухожильных и периостальных

рефлексов, нарушением походки по типу «утиной» [49]. Типичным признаком МДД являются симптом Говерса, при котором ребенок опирается на руки, чтобы подняться с пола, повышение уровня креатинфосфокиназы (КФК) в крови и псевдогипертрофия икроножных мышц, указывающая на замещение мышечной ткани фиброзной [50]. В дебюте заболевания ребенок испытывает трудности, связанные с движением, приводящие к нарушению походки [51].

Классификационные рубрики миодистрофии Дюшенна включают клиническую и молекулярно-генетическую, последняя основана на первичном дефекте гена. Клинически выделяют 5 стадий течения заболевания. В первой досимптомной стадии диагноз можно заподозрить только на основании повышения активности креатинфосфокиназы (КФК), печеночных ферментов в биохимическом анализе крови или наличия случаев заболевания в семейном анамнезе. После появления симптомов наступает ранняя амбулаторная стадия, при которой пациент имеет симптомы нарушения двигательного акта, но достаточно самостоятельно передвигается. На поздней амбулаторной стадии данные клинические характеристики становятся более выраженными и постепенно проявляются сердечные осложнения. После потери самостоятельной походки наступает ранняя неамбулаторная стадия с сохранением функции рук, далее наступает поздняя неамбулаторная стадия, при которой наступает полная утрата локомоторных функций, характеризующаяся абсолютной неспособностью пациента к самостоятельному передвижению и поддержанию вертикальной позы [52,53]. Средний возраст утраты возможности самостоятельно ходить составляет 10–12 лет. Данная стадия характеризуется выраженными деформациями позвоночника, контрактурами крупных и мелких суставов, прогрессирующей дыхательной и сердечной недостаточностью. В этой стадии требуются усилия всех членов мультидисциплинарной команды, включая ортопедические и хирургические вмешательства [54]. Прогрессирование ортопедической патологии при МДД и ее тяжесть зависят от разновидности течения заболевания. Миогенные контрактуры суставов при миодистрофии Дюшенна представляют собой типичное ортопедическое осложнение, обусловленное первичным поражением мышечной ткани и мышечным дисбалансом. Патологический процесс характеризуется развитием вялого пареза с преимущественно сгибательными, симметричными контрактурами верхних и нижних конечностей, возникающими вследствие поражения мышц-разгибателей. Прогрессирование контрактур напрямую коррелирует с тяжестью миодистрофического процесса, что проявляется последовательным снижением мышечной силы и изменением углов сгибания на различных стадиях заболевания [55,56].

По данным исследователей утрата возможности передвигаться наступала в среднем в возрасте 12 лет, а нарушение вентиляции легких началась примерно в 20 лет [57]. Средний возраст жизни сильно зависит от амбулаторности пациентов и вентиляции легких с возможностями хирургических вмешательств. Существуют международные различия в использовании кортикостероидов, хирургии сколиоза, вентиляции и физиотерапии [58].

Ортопедические осложнения при миодистрофии Дюшенна

характеризуются выраженными деформациями позвоночника, обусловленными прогрессирующей мышечной атрофией и ослаблением мышечного корсета. Сколиоз встречается при всех формах прогрессирующей мышечной дистрофии также имеет место к постоянному прогрессированию с возникновением тяжелой степени деформации, развитием сердечно-сосудистой и легочной недостаточности [59,60].

Из-за вовлечения сердечной мышцы в патологический процесс фенотип кардиомиопатии при МДД уточняется расположением, количеством и типом мутаций; нарушением функции и/или структуры пораженного белка; изменением Ca^{2+} -чувствительности филаментов и активности АТФ-азы; изменением саркоплазматической концентрации Ca^{2+} , модуляцией нейромедиаторов и гормонов, а также факторами внешней среды. Сочетание комбинаций указанных и, возможно, еще неизвестных факторов может определять манифестации различных фенотипов кардиомиопатии [61,62].

У 30% пациентов отмечается задержка психоречевого развития разной степени выраженности и поведенческие нарушения. У 20-30% пациентов имеют коэффициент интеллекта (IQ) менее 70. Степень когнитивных нарушений не коррелирует с тяжестью заболевания [63]. Патологическую основу умеренной когнитивной дисфункции вероятнее всего составляет изменение уровня дистрофина, экспрессируемого в мозге. Расстройства интеллекта, скорее всего, возникают, как следствие биологического эффекта от отсутствия дистрофина, чем из-за потери подвижности, что было доказано путем сравнения сопоставимых по возрасту больных с миодистрофией Дюшенна и спинальной мышечной атрофией [64]. Для семей, воспитывающих детей с МДД, сопутствующие заболевания головного мозга имеют большее влияние на семью, чем физические ограничения [65]. Исследование взаимосвязи когнитивных функций с экспрессией дистрофина в нервной ткани и результатами нейровизуализационных методик представляет критически важное направление в понимании патогенеза миодистрофии Дюшенна. Идентификация ключевых факторов, детерминирующих вариабельность когнитивных и поведенческих нарушений – от незначительных проявлений до полного отсутствия таковых, открывает перспективы для разработки персонализированных терапевтических стратегий и оптимизации курации пациентов [66].

При естественном течении МДД смерть наступает в возрасте 15–20 лет, чаще от сопутствующих инфекций или прогрессирующей сердечной и дыхательной недостаточности. Внедрение мультидисциплинарного подхода ведения пациента и соблюдение международных стандартов оказания медицинской помощи позволило увеличить продолжительность жизни пациентов в среднем до 28 лет (от 23 до 38,6 лет) [67].

1.3 Молекулярно-генетические аспекты диагностики миодистрофии Дюшенна

Современная диагностика МДД основана на оценке анамнестических, клинических данных, а также по результатам молекулярно-генетических

исследований. Диагноз миодистрофии Дюшенна должен идентифицироваться в следующих ситуациях: любая слабость мышц у мальчиков до 5 лет; нарушение походки; при всех случаях, сопровождающихся повышением уровня креатинфосфокиназы; беременные женщины, имеющие ребенка с установленным диагнозом миодистрофии Дюшенна; мать и родная сестра (сестры) пробанда для установления гетерозиготного носительства. В этих случаях принципиально важным аспектом является проведение молекулярно-генетического анализа [68,69].

Расшифровка генетического профиля человека и установление полной нуклеотидной последовательности генетического локуса *DMD* существенно оптимизировали диагностические возможности миодистрофии Дюшенна как для непосредственных пациентов, так и для членов их родственных групп или потенциальных гетерозиготных носителей патологических мутационных вариантов. Молекулярно-генетические методики исследования играют принципиально важную роль в пренатальной верификации, предоставляя возможность идентификации генетических отклонений на ранних стадиях внутриутробного развития плода. Применение подобных диагностических подходов позволяет верифицировать заболевание задолго до манифестации клинических или биохимических симптомокомплексов, что открывает широкие перспективы для превентивного терапевтического вмешательства и своевременной идентификации гетерозиготных носителей в семьях с высоким генетическим риском развития МДД.

Существует два основных подхода к молекулярной диагностике - прямая и косвенная (непрямая) ДНК-диагностика. Прямой метод основан на идентификации мутаций в самом гене *DMD*, что становится возможным при наличии детальной информации об экзон-интронной структуре гена. Основной задачей прямой диагностики является точное обнаружение патогенных мутаций, которые и приводят к развитию миодистрофии Дюшенна [70,71]. Таким образом, современные молекулярно-генетические технологии обеспечивают высокоточную диагностику, способствуя раннему вмешательству и повышая эффективность мониторинга пациентов и носителей мутаций.

В арсенале современных методов используются: саузерн блоттинг, мультиплексная ПЦР, мультилигазная реакция амплификации (Multiplex Ligation-depend Probe Amplification) и секвенирование гена (Next Generation Sequencing).

По происхождению мутаций в гене *DMD* характеризуются значительной частотностью; в каждом третьем случае миодистрофии Дюшенна этиологическим фактором выступает мутация *de novo*. Невзирая на существование современных высокоинформативных методик пренатальной диагностики и медико-генетического консультирования для семейных групп с верифицированными случаями заболевания, продолжение возникновения новых клинических случаев миодистрофии Дюшенна остается неизбежным [72,73]. Высокая частота возникновения новых мутаций в гене *DMD* объясняет широкое разнообразие мутаций, обнаруживаемых у пациентов с миодистрофией Дюшенна. Хотя большинство случаев (около 68%) связаны с

делецией или дупликацией одного или нескольких экзонов, также наблюдаются малые мутации (около 20% пациентов). Эти делеции и дупликации могут происходить в любом месте гена, но концентрируются между экзонами 45–55 и экзонами 2–10 для делеций и дупликаций, соответственно [74-76]. Часто неправильная рамка считывания содержит много стоп-кодонов, что приводит к преждевременному прекращению трансляции и продукции усеченного белка. Полученный дистрофин не имеет решающего домена, который соединяется с внеклеточным матриксом, и поэтому он не функционален и, как правило, нестабилен [77]. Существует несколько механизмов, посредством которых небольшие мутации в гене *DMD* нарушают синтез дистрофина. К числу таких мутаций относятся небольшие делеции или вставки, вызывающие сдвиг рамки считывания на уровне экзона. Подобным образом, обширные делеции или дупликации, нарушающие рамку считывания и охватывающие один или несколько экзонов, приводят к образованию укороченного либо нефункционального дистрофинового белка. Точечные мутации также могут приводить к возникновению преждевременного стоп-кодона, что вызывает раннее прекращение трансляции и образование неполноценного белка [78]. Кроме того, точечные мутации, а также небольшие делеции или вставки способны нарушать правильный процесс сплайсинга [79]. У небольшого числа пациентов (менее 1%) обнаруживаются редкие виды мутаций. Например, глубокие интронные мутации могут приводить к тому, что интронные последовательности ошибочно воспринимаются как экзоны [80].

Около 10% генетических мутаций не подчиняются правилу рамки считывания, то есть пациенты с мутациями в рамке считывания могут иметь МДД, а пациенты с мутациями вне рамки считывания могут иметь МДБ. Кроме того, для пациентов с МДБ и МДД тяжесть заболевания может варьироваться в зависимости от одних и тех же мутаций, разнообразие клинических проявлений миодистрофии Дюшенна, иногда даже в пределах одной семьи, включая различия в степени поражения сердца, указывает на то, что генетические модификаторы могут оказывать влияние на тяжесть заболевания [81,82]. Для мутаций со сдвигом рамки считывания расположение и размер мутаций могут до некоторой степени влиять на тяжесть заболевания. Мутации, которые устраняют домен, взаимодействующий с внеклеточным матриксом (кодируемый экзонами 64–70) или все актинсвязывающие домены (кодируемые экзонами 2–10 и экзонами 32–45), не приводят к функциональным белкам и, следовательно, связаны с МДД. Делеции в рамке считывания, затрагивающие первые 10 экзонов, удаляют первые два актинсвязывающих домена, но не затрагивают третий, кодируемый экзонами 32–45, что обычно приводит к фенотипу «тяжелой МДБ». Делеции в горячей области (экзоны 45–55) обычно связаны с более легкими проявлениями болезни. Делеции между экзонами 10 и 40 еще более мягкие и иногда связаны только с судорогами и миалгией, а иногда обнаруживаются у бессимптомных лиц [83].

С учётом того, что у подавляющего большинства пациентов с миодистрофией Дюшенна около 70% выявляются делеции или дупликации одного или нескольких экзонов гена *DMD*, наиболее эффективным и

экономически целесообразным шагом является первичное исследование на наличие именно этих типов мутаций. Для этого на сегодняшний день наиболее надёжным и точным методом является мультиплексная амплификация зондов, зависящая от лигирования (MLPA). Метод MLPA основан на использовании специальных наборов зондов, специфичных для каждого отдельного экзона гена *DMD*. Каждый набор зонда включает два олигонуклеотида, которые комплементарно связываются с соседними последовательностями внутри конкретного экзона [84]. Благодаря MLPA можно не только обнаруживать наличие делеций или дупликаций, но и количественно оценивать число копий каждого экзона, сравнивая высоту пиков на полученной диаграмме с контрольными образцами. Метод MLPA высокочувствителен и применяется для диагностики, как у пациентов, так и у предполагаемых носителей мутаций гена *DMD* [85,86].

Альтернативным методом является сравнительная гибридизация геномов с использованием микрочипов. В этом методе используются зонды, покрывающие как экзоны, так и интроны гена дистрофина. ДНК контроля и пациента фрагментируют и метят разными флуоресцентными красителями, а затем гибридизуют с зондами. Как и MLPA, этот метод определяет относительное количество копий каждого экзона. Однако, благодаря использованию зондов в интронах, он также позволяет точно определить местоположение точек прерывания в интронной области [87].

Если метод MLPA не выявляет наличие делеций или дупликаций в экзонах гена *DMD*, остаётся вероятность, что у пациента присутствует точечная небольшая мутация в одном из 79 экзонов. По статистике, около 20% пациентов с миодистрофией Дюшенна, имеют именно точечные мутации. Такие изменения можно обнаружить с помощью секвенирования отдельных экзонов методом Сэнгера. Однако данный подход является более затратным и трудоёмким по сравнению с MLPA [88]. В будущем традиционные методы, вероятно, будут заменены более современными методами секвенирования следующего поколения [89,90].

Своевременная диагностика МДД играет критическую роль в улучшении прогноза заболевания. Генетическая идентификация мутации, вызывающей патологию, имеет значительное влияние на семью пациента, позволяя принять меры для дальнейшего ведения заболевания и предотвращения его распространения среди родственников. После обнаружения патогенной мутации у ребёнка необходимо провести тестирование матери для определения её носительства. Хотя женщины-носительницы, как правило, не проявляют клинических симптомов, существует риск развития кардиомиопатии, что требует регулярного наблюдения и своевременного медицинского вмешательства при выявлении патологий сердца. Выявление гетерозиготного носительства у матери имеет большое значение для генетического консультирования и семейного планирования. Эта информация позволяет оценить вероятность передачи мутации дочерям, сёстрам, двоюродным сёстрам и тётям, которые также могут быть потенциальными носительницами. Однако, даже если результаты анализа указывают на отсутствие мутации у матери,

остаётся риск мозаицизма зародышевой линии. В таких случаях часть её половых клеток может нести мутацию, что создаёт вероятность рождения следующего ребёнка, поражённого миодистрофией Дюшенна [91,92]. Таким образом, генетическая диагностика и консультирование способствуют раннему выявлению носителей и позволяют принять осознанные решения при планировании будущих беременностей, минимизируя риски наследственных заболеваний.

Генетическая идентификация этих мутаций играет критически важную роль для пациентов, так как позволяет определить прогноз патологии, провести квалифицированное генетическое консультирование и установить соответствие пациента критериям для инновационных методов терапии [93]. Так как мышечная атрофия при этих заболеваниях прогрессирует и является необратимой, крайне важно провести диагностику на ранних этапах. Это позволит своевременно назначить лечение, которое может быть эффективным на начальной стадии болезни. На сегодняшний день средний возраст постановки диагноза в специализированных медицинских учреждениях составляет 4,1 года. Этот показатель демонстрирует улучшение по сравнению с 2000 годом, когда средний возраст диагностики был равен 4,5 года. Дальнейшее сокращение этого периода возможно благодаря повышению уровня информированности врачей первичной медицинской помощи и других специалистов, осуществляющих мониторинг детей раннего возраста. Своевременное выявление характерных симптомов МДД позволит ускорить процесс диагностики и начало терапии. В связи с активным развитием новых патогенетических и генетических методов лечения рассматривается возможность внедрения неонатального скрининга для раннего выявления миодистрофии Дюшенна. Внедрение такой программы позволит диагностировать заболевание на доклинической стадии и, следовательно, начать терапевтические мероприятия до появления выраженных симптомов, что может существенно улучшить прогноз для пациентов [94].

Все больше изучаемой концепцией на сегодняшний день является предсказание «генотип-фенотип» на основе мутаций в гене, при котором важным аспектом является не только мутация и ее характеристики, но и их расположение в гене с функциональным воздействием на рамку считывания. Расположение мутации в гене *DMD* может определять фенотипический профиль пациента через дифференциальную экспрессию этих изоформ [50, p. 1426]. Несмотря на то, что рамка считывания позволяет прогнозировать степень слабости скелетных мышц, существует некоторая фенотипическая изменчивость в пределах прогноза. Генетические модификаторы, вероятно, играют определенную роль в этой фенотипической изменчивости [95]. На сегодняшний день используемые и экспериментальные терапевтические стратегии основаны на функциональных характеристиках мутаций этого гена.

На основании актуального протокола диагностики и лечения, также мировой опыт показывает, что диагностический поиск имеет этапность, где обязательным критерием постановки диагноза является генетическая верификация. Как указывалось, ген *DMD* является большим по протяженности

и имеет 79 экзонов, мутация может произойти на любом участке этого гена. Поэтому определение ПЦР методом только горячих точек является не всегда успешным, так как четко описанных и ограниченных мажорных мутаций до сегодняшнего дня не описаны. Проведение мультиплексного анализа в 80-85% случаев определяет те или иные крупные мутации, что может стать лучшим инструментом для быстрого и скринингового обследования. Для поиска точечных мутаций, однонуклеотидных замен или других изменений применяется секвенирование гена, как наиболее достоверный метод. Применение в совокупности всех этих методов в медицинской практике на основе клинических настороженностей врачей может создать путь к ранней диагностике с последующей своевременной терапией и реабилитацией.

1.4 Современные стратегии терапии миодистрофии Дюшенна

Основу лечения миодистрофии Дюшенна составляет терапия пероральными глюкокортикостероидами в сочетании с мультидисциплинарным подходом к ведению пациента. Комплексное наблюдение включает ортопедическую коррекцию, респираторную поддержку, кардиологическую помощь и нутритивное сопровождение. Такой подход направлен на улучшение прогноза заболевания, увеличение продолжительности жизни, поддержание подвижности и уровня самообслуживания пациента. Кроме того, эти меры способствуют повышению общего качества жизни и минимизации осложнений, связанных с прогрессирующей мышечной слабостью [96,97].

Создание надёжных критериев оценки результатов для МДД способствовало совершенствованию методологии проведения клинических испытаний новых препаратов. Эти агенты можно разделить на 3 стратегии: 1) уменьшение дистрофических механизмов заболевания; 2) модуляция экспрессии белка утrophина и 3) восстановление экспрессии белка дистрофина [98-101].

Уменьшение дистрофических механизмов подразумевает применение гормональных и негормональных агентов, которые снижают дегенеративные и воспалительные изменения в мышечных волокнах. Лечение глюкокортикостероидами является стандартом лечения пациентов с МДД. Польза от применения кортикостероидов становится заметной уже через несколько месяцев после начала лечения. Инициация терапии кортикостероидными препаратами в раннем возрастном периоде демонстрирует корреляцию с более оптимальными клиническими результатами. Масштабное обсервационное исследование, реализованное в исследовательской сети CINRG, продемонстрировало, что пролонгированное применение кортикостероидов обеспечило позитивную динамику, в частности, в аспекте сохранения и поддержания двигательных функций. Другое исследование показало снижение потребности в хирургии сколиоза. В многоцентровом рандомизированном двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании сравнивали эффективность Дефлазакорта и Преднизолонa и плацебо, было завершено в 1995 г. и продемонстрировало данные, свидетельствующие о возможном превосходстве Дефлазакорта над

Преднизолоном [102-104]. В настоящее время использование стероидов является предварительным условием для участия в большинстве интервенционных клинических исследований МДД.

Главной целью всех видов терапии является восстановление белка дистрофина или подавление процессов, препятствующих экспрессии этого белка в мышечных волокнах. Значительной гомологией дистрофина продемонстрировал себя белок утrophин, который был идентифицирован как «белок, связанный с дистрофином», однако в отличие от дистрофина, утrophин экспрессируется в основном в нервно-мышечных соединениях. Одним из активаторов транскрипции утrophина является препарат Эзутромид, который был выявлен в ходе скрининга малых молекул [105]. Однако клиническое исследование II фазы Эзутромид у пациентов с миодистрофией Дюшенна не показало значительного терапевтического эффекта.

Конечным ожидаемым эффектом многих терапевтических линий являются попытки восстановления белка дистрофина. В настоящее время используются ряд стратегий для восстановления экспрессии белка дистрофина, большинство из которых не предназначены для восстановления нативного белка дикого типа. Тем не менее, экспрессия измененного белка дистрофина может давать лучший фенотип, чем отсутствие экспрессии или усеченный, нестабильный белок [106]. Одним из одобренных лекарственных средств, предназначенный для экспрессии белка дистрофина при нонсенс-мутации является препарат Аталурен (Трансларна). Эта молекула изучалась на людях, совсем недавно [107,108].

При оценке совокупности доказательств эффективности препарата у пациентов с нонсенс-мутацией мышечной дистрофии Дюшенна можно ознакомиться с данными двух завершенных рандомизированных контролируемых исследований. Мета-анализ изучил изменение 6MWT по сравнению с исходным уровнем на 48 неделе. Результаты показали, что статистически значимые различия в изменении 6MWT при приеме препарата по сравнению с плацебо наблюдались во всех трех метаанализах. Эти метаанализы подтверждают предыдущие доказательства того, что Трансларна замедляет прогрессирование заболевания по сравнению с плацебо у пациентов с МДД в течение 48 недель [109,110]. На сегодняшний день в официальных инструкциях для применения разрешен и показан для детей от 2 лет и старше и амбулаторным пациентам. Эффективность для неамбулаторных пациентов мало изучена. Хотя есть продолжающиеся исследования у неамбулаторных пациентов, где намного могут улучшить функции верхних конечностей и дыхательную функцию. Изучаются в целом влияние препарата на состояние здоровья и полезность у пациентов с нонсенс-мутацией мышечной дистрофии Дюшенна [111]. В некоторых работах стремились изучить консенсус клинических экспертов по этим темам в панельном исследовании Delphi в отношении амбулаторных и неамбулаторных пациентов, и результаты этого исследования подтверждают ассоциацию Трансларны для лечения МДД при нонсенс мутациях с улучшением состояния здоровья и полезностью [112-114].

Следующим возможным механизмом восстановления дистрофина является

метод пропуска экзона. Термин «пропуск экзона» обычно относится к использованию синтетических антисмысловых олигонуклеотидов для ингибирования сайта сплайсинга, чтобы предотвратить участие конкретного экзона в сплайсинге. Как предсказано правилом рамки считывания, делеционные мутации, которые сдвигают рамку считывания, могут привести к усеченному и/или нестабильному белку. Однако у некоторых пациентов может быть делеция, при которой рамка считывания может быть восстановлена путем пропуска дополнительного экзона, смежного с делецией. Измененный транскрипт будет укорочен, но эта укороченная кодирующая последовательность не будет иметь нарушенной рамки считывания, что позволит экспрессировать стабильный функциональный белок [115].

Согласно данным об особенностях мутаций, собранным из большой базы пациентов с МДД, примерно у 14% из них выявлены делеции, приводящие к сдвигу рамки считывания, которые могут быть скорректированы с помощью пропуска 51-го экзона. Этот процент превышает долю пациентов, для которых восстановление рамки считывания возможно путём исключения других экзонов [116-118]. Помимо этого, существуют одобренные антисмысловые олигонуклеотиды, направленные на экзон-скиппинг: для пропуска 53-го экзона применяются Голодирсен и Вилтоларсен, а для пропуска 45-го экзона – Касимерсен. Основываясь на данных о распространенности МДД с соответствующими мутациями (подлежащими пропуску экзона) можно говорить о том, что кандидатами на препарат Касимерсен являются от 8,1% до 9% пациентов с МДД [119,120], тогда как кандидатами на препарат Голодирсеном – от 7,7 до 10,1% [121-123].

Многообещающими исследованиями являются изучения в области генной терапии, как метод, восстанавливающий белок дистрофин. На сегодняшний день проведено 309 клинических испытаний (одобренные FDA) методов лечения на основе AAV (Luxturna, Zolgensma, Hemgenix, Elevidys и Roctavian), которые находятся на переднем крае генной терапии [124-126]. Однако становится все более очевидным, что у AAV-векторов первого поколения есть два основных ограничения: (1) встречающиеся в природе капсиды запускают иммунный ответ, особенно при высоких дозах, и (2) одноцепочечный геном, который в настоящее время используется в большинстве AAV-векторов, менее эффективен в транскрипционном отношении. Более конкретно, в ряде клинических испытаний было задокументировано, что введение высоких доз переносчиков AAV приводит к снижению эффективности, индуцирует иммунный ответ цитотоксических Т-лимфоцитов хозяина на капсидные белки [127-129]. На клиническом уровне этот иммунный ответ приводит к удалению клеток-мишеней, экспрессирующих терапевтический ген, а также к серьезным побочным явлениям у пациентов. Недавно, использование векторов AAV8 первого поколения в клинических испытаниях I/II фазы для лечения X-сцепленной миотубулярной миопатии привело к летальным исходам. Эти результаты подчёркивают необходимость разработки более эффективных векторов AAV, которые можно было бы вводить пациентам в более низких дозах без ущерба для клинической эффективности [130,131]. В связи с большим

размером белка дистрофина полная генная терапия возможна только при применении больших вирусов и в настоящее время активно участвуют 3 программы генной терапии, использующие аденовирус [132], не все из которых раскрыли публично свои результаты. Одним из клинически значимых препятствий в области применения векторов вируса является наличие у пациентов иммунитета к вектору AAV, что делает их не кандидатами на генную терапию. Некоторые исследователи предложили использовать плазмаферез и другие меры по ослаблению иммунитета к вектору AAV [133,134]. Хотя стратегии генной терапии направлены на восстановление оптимизированного белка, экспрессируемый белок все равно не является полноценным белком дистрофина и, следовательно, может считаться несовершенным [135]. Даже при наилучшем сценарии использования современных терапевтических подходов, следует ожидать некоторого прогрессирования миодистрофии Дюшенна по мере течения заболевания. Тем не менее, проводимое лечение способно существенно замедлить этот процесс и отсрочить развитие тяжёлых осложнений. Одним из важных вопросов, связанных с применением генной терапии, является долговременная эффективность и устойчивость терапевтического эффекта. Возникает необходимость тщательного мониторинга пациентов для оценки стабильности достигнутых результатов и определения необходимости повторного вмешательства [136]. Поскольку геном AAV обычно не интегрируется в геном хозяина, трансген микро/минидистрофина будет сохраняться в клетках-хозяевах, как эписома и не будет реплицироваться во время митоза. Таким образом, в любой ткани с клеточным делением или обновлением (например, в мышцах с легкой дистрофией) трансген может со временем стать «разбавленным» или «потерянным» [137]. Проблема дозирования генной терапии на основе аденоассоциированных вирусов (AAV) связана с риском развития иммунного ответа на вектор. В результате первичного введения формируется иммунитет к AAV, что делает последующее повторное дозирование невозможным без применения специальных протоколов для обхода иммунной реакции организма. Кроме того, существует вероятность редких случаев интеграции вирусного вектора в геном хозяина. Если такая интеграция происходит с высокой частотой, это может повлиять на экспрессию эндогенных генов и вызвать потенциальные генетические нарушения [138,139]. Эти риски подчёркивают необходимость разработки методов подавления иммунного ответа и изучения долгосрочных эффектов генной терапии для обеспечения её безопасности и эффективности. Несмотря на достигнутый значительный прогресс в области разработки патогенетических методов терапии, данный подход покрывает и обеспечивает лечение около 30-35% детей с МДД, продлевая их продолжительность качественной жизни, сохраняя длительность их амбулаторности. Существуют множества генетических и клинических факторов, среди которых можно отметить нестабильность гена, которая может привести к теоретически неожиданным и непредсказуемым результатам при применении различных новых методов терапии. В этой связи, всестороннее изучение гена в различных его мутационных вариациях в

сопоставлении «генотип-фенотип» в различных группах детей с разными сроками заболевания, а также с учетом типа унаследования заболевания поможет лучше понять эту мультидисциплинарную нозологию. Для более глубокого понимания МДД и разработки более эффективных методов лечения необходимы всесторонние исследования гена *DMD* в разных его вариантах. В этой связи, важно установить связь между генетическими изменениями (генотипом) и проявлениями заболевания (фенотипом) у детей с разной стадией МДД и разным типом наследования, что и явилось предметом нашего исследования.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Общая характеристика исследования

Данное исследование проведено в рамках научно-исследовательских работ с внутривузовским грантовым финансированием №0119РКИ0240 «Генетическая характеристика миодистрофии Дюшенна в Республике Казахстан» (одобрено этическим комитетом ЗКМУ имени Марата Оспанова, от 17.06.2019 г., Заседание №4).

Настоящее исследование проводилось с выездом в различные регионы Казахстана: Актюбинская область, Западно-Казахстанская область, Мангистауская область, Атырауская область, Карагандинская область, Акмолинская область, Костанайская область, г. Астана и Петропавловск.

Осмотр пациентов, забор крови для проведения молекулярно-генетического исследования проводились в лечебных учреждениях данных регионов. В исследовании были использованы образцы ДНК, полученные от пациентов с подозрением на миодистрофию Дюшенна. После генетической верификации мутации у ребенка, для определения варианта унаследования производили забор крови у матерей.

Критерии включения:

- дети мужского пола;
- мышечная слабость по шкале $MRC \leq 2$;
- любое нарушение походки и осанки;
- наличие в семье детей с МДД.

Критерии исключения:

- генетически верифицированные другие нервно-мышечные заболевания;
- органическое поражение ЦНС (центральные параличи).

В соответствии с целями и задачами диссертационной работы разработан дизайн исследования, определяющий выбор пациентов и методов исследования.

Исследование является комбинированным, изучающее частоту встречаемости миодистрофии Дюшенна, вопросы наследования заболевания (обследование матерей на носительство мутации), клинические особенности в зависимости от характеристик мутаций и на основе получаемой стандартной базовой глюкокортикостероидной (ГКС) и таргетной (при нонсенс мутации препаратом Аталурен (Трансларна)) терапии.

Дизайн первой и второй задачи – одномоментно – поперечное исследование; третьей задачи – проспективное когортное исследование. В рамках третьей задачи описан функциональный статус детей с МДД на момент первичного осмотра и через 12 месяцев для оценки прогрессирования заболевания.

Клиническая характеристика основывалась на определении возраста дебюта заболевания, возраста потери амбулаторности, функционального состояния, результаты которых описаны в соответствии мутациями и их расположения в гене с функциональным воздействием на рамку считывания генетического кода, а также оценивалось влияние ГКС терапии и таргетной

терапии препаратом Аталурен (Трансларна) на клинические исходы.

Глюкокортикостероидная терапия составляет основу терапии МДД (согласно клиническому протоколу) и является базовой стандартной терапией. Применяется Преднизолон или Дефлазокорт. Стандартно начинается ГКС терапия с 4-х лет, консилиумно можно начинать и в более раннем возрасте при необходимости, решается в индивидуальном порядке. Доза Преднизолона должна составлять 0,75 мг/кг, Дефлазакорта – 0,9 мг/кг для амбулаторных детей, для неамбулаторных детей половинная доза и при необходимости и меньшая доза. ГКС препарат принимается ежедневно однократно перорально, запивается молоком.

Препарат Аталурен (Трансларна) применяется исключительно при нонсенс мутации у амбулаторных детей старше 2-х лет, согласно инструкции (Приложение Д). Лекарственное средство Трансларна™ доступно в саше по 125, 250 и 1000 мг. Рекомендуемая доза составляет 10 мг/кг массы тела утром, 10 мг/кг массы тела в обеденное время, и 20 мг/кг массы тела вечером (с тем, чтобы общая суточная доза составила 40 мг/кг массы тела). Выпускаются в виде гранул для приготовления суспензии для приема внутрь, предварительно смешивая в жидкой или полутвердой пище.

Дизайн исследования и основные характеристики представлены в соответствии с задачами исследования на рисунке 1.

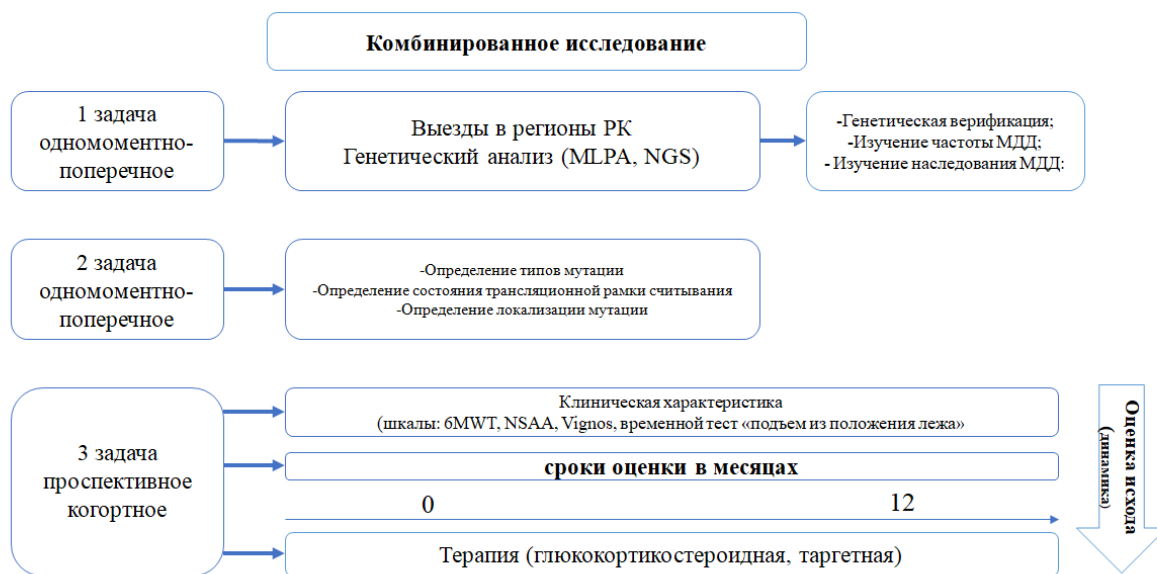


Рисунок 1 – Дизайн исследования

Использована сплошная последовательная выборка. С поправкой по альфа-ошибке 5% и бета-порогом 20% (мощность 80%), для достижения предсказательной силы 0,95 и в соответствии с нашими критериями отбора и согласно статистическим данным РК репрезентативная выборка должна составить 64 детей.

Осмотрено 269 детей с мышечной слабостью, из которых критериям включения соответствовали 127 детей, для которых проведен генетический анализ и подтвержден диагноз МДД у 106 детей. Для определения варианта унаследования мутации у 75 детей с крупными мутациями генетически верифицировали на предмет носительства 45 матерей. Формирование окончательной выборки представлено на рисунке 2.



Рисунок 2 – Формирование выборки

Верификация диагноза проводилась согласно международным рекомендациям и стандартам, а также клиническому протоколу РЦРЗ МЗ РК за протоколом №63 от 19.04.2019 г.

В работе соблюдены принципы Хельсинской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации (World Medical Association of Helsinki, 1964, обновленной в октябре 2013 г. на 64-ой Генеральной Ассамблее ВМА, Форталеза, Бразилия).

Разрешение на проведение исследования было получено от Локальной Комиссии по Биоэтике при НАО «ЗКМУ имени М. Оспанова» №24 от 17.06.2019 г. Заседание №4.

2.2 Клинические методы исследования

Для описания клинического состояния пациентов применялись следующие функциональные шкалы: для оценки мышечной силы – шкала MRC (Medical Research Council Paralysis Scale, 1976); для измерения двигательных способностей применялись шкалы P.J.Vignos 1963 и NSAA (North Star Ambulatory Assessment). Также применялись временные тесты (тест на 6-ти минутную ходьбу (6MWT) и тест «подъем из положения лежа».

Шкала Medical Research Council (MRC). Методика предназначена для количественной оценки мышечной силы. Сила мышц, т.е. способность мышц

сокращаться, преодолевая определенную нагрузку, наносимую исследователем, где 0 баллов соответствует отсутствию мышечной силы, 5 баллов – полная сохранность двигательной функции:

0 баллов - отсутствие всех движений;

1 балл - сокращение части мышц без двигательного эффекта в соответствующем суставе;

2 балла - сокращение мышц с двигательным эффектом в суставе без возможности подъема конечности;

3 балла - сокращение мышц с подъемом конечности без возможности преодоления дополнительной нагрузки, прикладываемой рукой исследующего;

4 балла - активное движение конечности с возможностью преодоления нагрузки, прикладываемой рукой исследующего;

5 баллов - исследующий не может преодолеть сопротивление обследуемого при разгибании его руки - нормальная сила.

Шкала Vignos. Шкала содержит 10 уровней классов, где 1 класс – минимальные нарушения; 10 класс – нет функции. Шкала применяется как амбулаторным, так и неамбулаторным пациентам. Оценивается динамика прогрессирования заболевания.

1 класс - ходит и поднимается по лестнице без посторонней помощи;

2 класс - гуляет и лазает по лестнице с помощью перил;

3 класс - ходит и поднимается по лестнице медленно с помощью перил (25 секунд за восемь стандартных шагов);

4 класс - ходит без посторонней помощи и поднимается со стула, но не может подниматься по лестнице;

5 класс - ходит без посторонней помощи, но не может подняться со стула или подниматься по лестнице;

6 класс - ходит только с посторонней помощью или ходит самостоятельно с длинными ортезами для ног;

7 класс - ходит в длинных вертикальных ортезах для скреп ноги, но нуждается в помощи для баланса;

8 класс - стоит в длинных вертикальных ортезах ноги, но не может идти даже с посторонней помощью;

9 класс - в инвалидном кресле;

10 класс - прикован к постели.

Шкала «Северная Звезда» - North Star Ambulatory Assessment (NSAA) представляет собой шкалу, состоящую из 17 пунктов, которая служит для оценки функциональных возможностей пациента, разработана и валидирована для измерения двигательных способностей пациентов МДД. Оценка 0 баллов ставится, если пациент неспособен выполнять самостоятельно пробу, 1 – выполняет самостоятельно, но с использованием модифицированного метода и 2 – выполняет без компенсации, то есть способен выполнять независимо. Общий балл NSAA представляет собой сумму баллов по всем видам деятельности и варьируется от 0 до 34, причем более высокие баллы указывают на улучшение функции (приложение Е).

Тест на 6-ти минутную ходьбу (6Minute Walk Test, 6MWT) – проводится

в помещении, имеющем достаточно длинный коридор с твердым покрытием. Длина проходимого пути должна составлять 25 метров с разметкой каждые 3 метра, а также точками поворотов/разворотов. Пациент получает инструкцию о необходимости идти с максимально возможной скоростью (но не бежать) в течение 6 минут, а кто-то из наблюдающих помогает ему не упасть и подбадривает, в то время как другой человек засекает время ходьбы с помощью секундомера. В тесте оценивается дистанция в метрах, пройденная пациентом за 6 минут без вынужденных остановок.

Временной тест «подъем с положения лежа» - используется для оценки подвижности и координации ребенка, а также его способности быстро переходить из одного положения тела в другое. В рамках этого теста ребенок должен быстро и безошибочно подняться из положения лёжа на спине в положение стоя. Интерпретация результатов теста зависит от нескольких факторов, таких как скорость выполнения упражнения, наличие трудностей при переходе из одного положения в другое, а также использование посторонней помощи. Результат фиксируется в секундах. Тест не является диагностическим, применяется для оценки состояния в динамике заболевания.

2.3 Молекулярно-генетические методы исследования

Биологическим материалом послужила ДНК, выделенная из крови. У всех пациентов (в последующем и у матерей) производили забор крови из кубитальной вены стандартным методом. Цельная кровь в пробирке с ЭДТА транспортировалась с сохранением всех требований в г. Астана, в генетическую лабораторию Корпоративного Фонда «University Medical Center» - Национальный научный центр материнства и детства (по договору в рамках грантового проекта). ДНК выделяли стандартным Фенол-Хлороформным методом с применением готовых наборов производителя. Проводился анализ MLPA с использованием коммерческих наборов для проведения MLPA анализа фирмы MRC-Holland, содержащие смесь проб (зондов) P034/P035 *DMD*. Данные смеси содержат пробы, позволяющие проводить анализ дупликации или делеции 79 экзонов гена дистрофина, а также контрольные точки. В панель P034 входят зонды, подобранные к экзонам 1-10, 21-29, 41-50, 61-70, а также 10 референтных зондов, специфичных X-хромосоме и 1 зонд к Y-хромосоме. В панель P035 входят зонды, подобранные к экзонам 11-20, 31-40, 51-60, 71-79, а также 9 референтных зондов, специфичных X-хромосоме и 1 зонд к Y-хромосоме. Для анализа на первом этапе были подготовлены пробы ДНК, с этой целью развели образцы ДНК в ТЕ буфере до финальной концентрации 30 нг/мкл. 5 мкл ДНК (150 нг) поместили в 0,2 мл ПЦР пробирки и денатурировали при 98°C в течение 5 минут. После чего к образцам ДНК добавили лигазный буфер и пробы, полученную смесь денатурировали при 95°C в течение 1 минуты, с последующей гибридизацией проб при 60°C в течение 14-18 часов. По истечении времени переводили температуры амплификатора в 54°C и немедленно добавляли лигазную смесь, содержащую фермент Лигаза-65, и лигировали пробы при 54°C в течение 15 минут. После лигирования инактивировали фермент при 98°C в течение 5 минут, охлаждали

пробирки до 10°C и использовали для последующей амплификации лигированных проб методом ПЦР. Для амплификации использовались флуоресцентные праймеры и реагенты, поставляемые в наборе. Программу ПЦР лигирования и амплификации выполняли на программируемом амплификаторе Master cyclerProS (Eppendorf, Германия). Амплифицированные ПЦР продукты разводили в формамиде 50 раз, добавляли размерный стандарт Liz 500. Полученную смесь денатурировали при 95°C в течение 5 минут, резко охлаждали во льду. Разделяли продукты MLPA анализа на автоматическом генетическом анализаторе 3730xl DNA analyzer. При разделении использовали следующие параметры: капилляры 50 см, полимер POP-7, фильтр G5, напряжение впрыска: 1,6 кВ; время впрыска 15 сек, напряжение прогона: 10 кВ; время прогона 2800 секунд, учет флуоресценции через 500 секунд. При каждой постановке MLPA наряду с исследуемыми пробами проводили анализ контрольного образца ДНК (без мутаций) и для контроля контаминации использовали TE буфер. Для обработки результатов использовали программное обеспечение Coffalyser DBv.130 - MRC-Holland//<http://www.mlpa.com/coffalyser/download.html>.

Секвенирование гена. NGS (Next Generation Sequencing). NGS — это перспективный метод для диагностики МДД, позволяющий выявить широкий спектр мутаций в гене DMD и улучшить понимание механизмов заболевания. NGS может использоваться в качестве единой всеобъемлющей платформы для обнаружения мутаций и диагностики МДД. NGS может обнаруживать вариации, которые не обнаруживаются MLPA, что делает его необходимым методом для второго этапа тестирования на МДД. Принцип NGS основан на массовом параллельном секвенировании специальным образом подготовленных однонитевых библиотек фрагментированной ДНК исследуемых образцов, высушенных на фильтрационных картах (Dried Blood Spots). Данная методика позволяет определить точечные мутации, однонуклеотидные замены или выпадения, дубликации. Большинство технологий высокопроизводительного секвенирования включают в себя следующие этапы: подготовку библиотек, непосредственно секвенирование и анализ полученных данных. В нашем исследовании данный метод проводился в лаборатории Centogene, Германия. Финансовую поддержку и анализ данных секвенирования обеспечивала компания «Пи-Ти-Си Терапьютикс Казахстан».

В работе использованы информационные методы, включающие использование базу данных NCBI, OMIM, GenBank, UMD Treat, UCSC Genome Browser, Clin Var, сервисы предсказания патогенности проводились по базам Polyphen, SIFT, Mutation Taster, Align-GVGD, gnom AD, 1000G, Cento MD.

Для расчета рамки считывания использовали Reading Frame Checker Leidend модели гена DMD.

Локализация мутаций в гене *DMD* определялась согласно экзонам: мутации, затрагивающие экзоны 2-10 и 32-45 — относились к актинсвязывающему участку, в 45-55 экзонах — центральный участок — «горячая область» и в 64-70 — концевая дистальная часть гена — участок, ответственный за присоединение ДГК вне матрикса (Приложение Ж).

2.4 Методы статистической обработки результатов исследования

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программы «STATISTICA 10.0» фирмы StatSoft, Inc. США. Статистический анализ: проверку нулевой гипотезы об отсутствии различий между наблюдаемым распределением признака и теоретическим ожидаемым нормальным распределением выполняли с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. Оценку различий между выборками проводили: при нормальном распределении парных переменных с использованием t-критерия Стьюдента и ANOVA в случае множественных независимых; при отсутствии нормального распределения и в случае парных независимых совокупностей с использованием U-критериев Манна-Уитни и ранговый дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса. Рассчитывались среднеарифметические значения количественных показателей, представленных в тексте в виде $M \pm SD$, где M – средняя арифметическая, SD – стандартное отклонение, для качественных показателей в виде %, ДИ для доли. Для определения вероятности статуса неамбулаторности у детей с миодистрофией Дюшенна в зависимости от факторов был использован метод бинарной логистической регрессии и оценка безрецидивной выживаемости с помощью кривой Каплана-Майера. Во всех процедурах статистического анализа уровень значимости принимался $p \leq 0,05$.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Частота встречаемости и наследования МДД

Исследование проводилось с выездом в 9 регионов Казахстана, проводился забор венозной крови у 127 детей для генетической верификации МДД.

По результатам генетического анализа MLPA у 75 детей из 127 отмечались крупные мутации в виде делеций и дупликаций, в 52 случаях результат MLPA был отрицательным (крупные мутации отсутствовали). У 52 пациентов, с MLPA отрицательным статусом для поиска точечных мутаций проведено секвенирование гена *DMD*, при котором в 31 случае идентифицированы точечные мутации, в 21 – мутации не выявлены. Таким образом, генетически верифицировали МДД у 106 детей. Данные приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Количество выявленных случаев МДД по областям

Регионы	Количество детей
Актюбинская область	25
Мангистауская область	20
Акмолинскую область	17
г. Астана	16
Западно-Казахстанская область	12
Атырауская область	7
Костанайская область	4
Карагандинская область	3
г. Петропавловск	2
Итого	106

Как видно из таблицы 1, выявленные случаи МДД составили 106. Согласно количеству мальчиков до 5 лет в изученных нами областях (350991 детей; bala.stat.gov.kz), частота встречаемости данного заболевания, определена как 1 случай на 3311 мальчиков.

Изучение частоты МДД в разрезе изученных областей показано на рисунке 3.

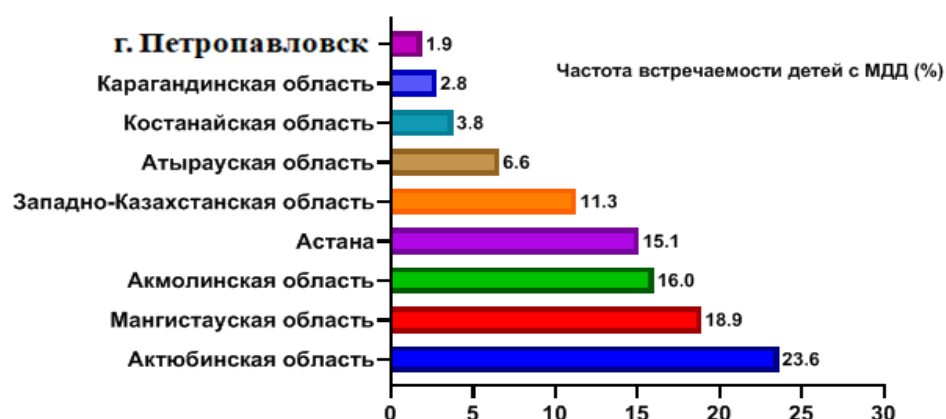


Рисунок 3 – Частота встречаемости МДД в регионах

На рисунке 3 отмечается превалирование диагностированных вариантов МДД в Актюбинской области, вероятно, это связано с диагностическими возможностями.

Дети с МДД (106 детей) были из 91 семьи (матерей), так как некоторые семьи имели 2 и/или более детей с заболеванием МДД. Дети, имеющие крупные мутации, верифицированные методом MLPA (75 детей), были от 68 матерей. Для определения варианта унаследования мутации у 75 детей с крупными мутациями генетически верифицировали на предмет носительства 45 матерей (подписавшие информированное согласие) из 68. У 31 ребенка (от 23 матерей), имеющих точечную мутацию, верифицированную методом секвенирования гена, вариант унаследования мутации не изучали. Статус носительства у матерей верифицировался только MLPA анализом, так как проведение секвенирования гена для матерей, недоступно в Казахстане.

Определение вида наследования проводилось генетической верификацией матери с поиском уже известной мутации у сына (больной МДД). Статус носительства у матери определялся у 45, положительный статус которых составил 29 (64,4%) случаев, отрицательный – 16 (35,6%) случаев (рисунок 4).

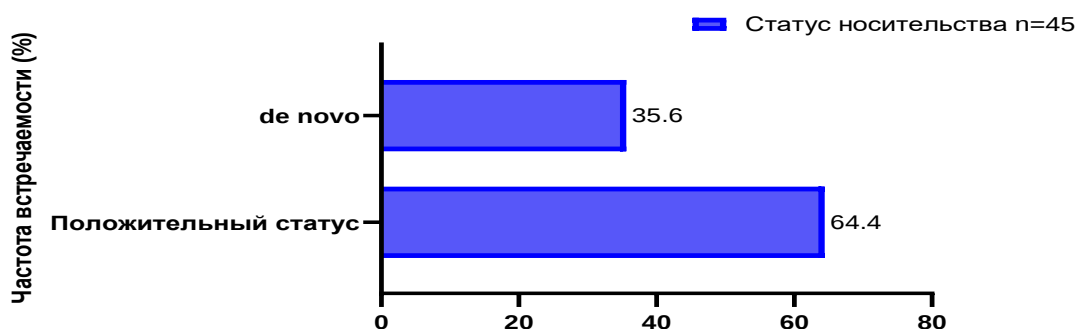


Рисунок 4 – Частота наследования МДД

Как видно из рисунка 4, спонтанные – de novo мутации составили треть случаев (35,6%).

Таким образом, частота встречаемости миодистрофии Дюшенна составила 1 случай на 3311 мальчиков, X-сцепленный вариант наследования мутации составил 64,4%, тогда как спонтанные de novo мутации составили 35,6%.

3.2 Анализ спектра мутаций в гене *DMD*

В нашем исследовании на основе результатов MLPA анализа и секвенирования гена *DMD* идентифицированы 106 различных мутаций. Описание обнаруженных мутаций проводилось для 91 случая, так как в 15 случаях были сибсы с идентичными типами мутаций. Структура 91 типов мутаций включала крупные мутации в виде делеций и дупликаций в 64 случаях (70,3%) и точечные мутации в 27 (29,7%) случае (рисунок 5).

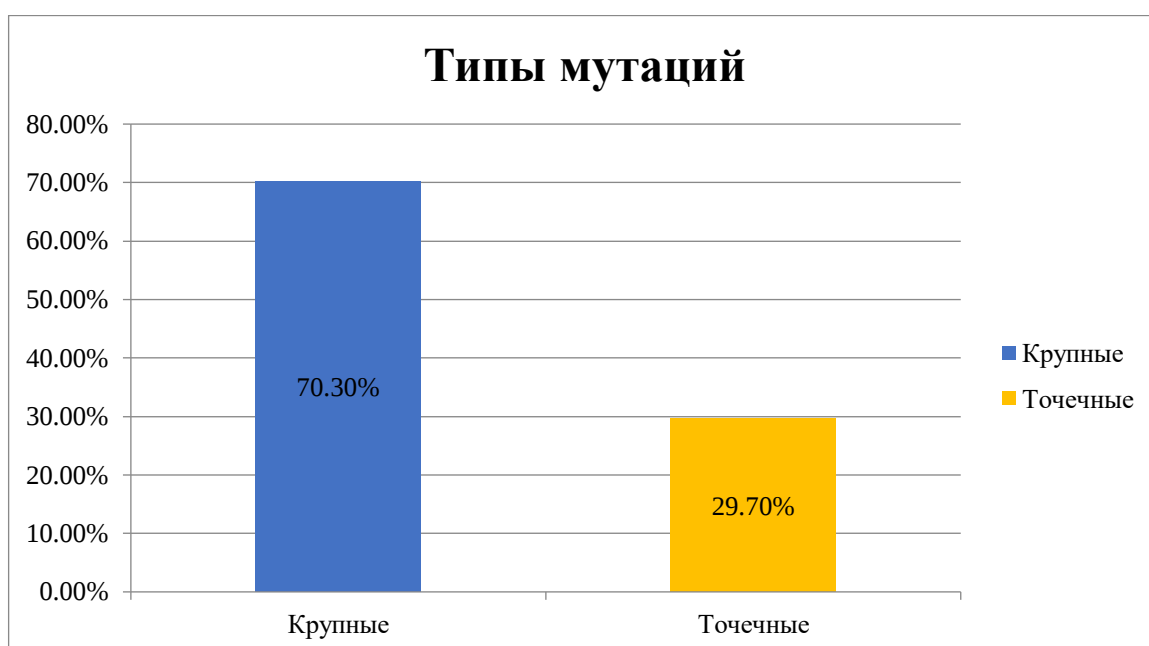


Рисунок 5 – Ранжирование мутаций

На рисунке 5 представлено превалирование крупных мутаций. Структура крупных мутаций представлена делециями – в 54 (59,3%) случае и дупликациями – в 10 (11%) случаях из 91. Точечные мутации составили 27 (29,7%) случаи из 91 (таблица 2).

Таблица 2 – Частота мутаций в гене *DMD*

Тип мутации	Общее количество	Выявленные	95% ДИ нижний	95% ДИ верхний
Делеции	91	59,3%	51,9%	68,9%
Дупликации	91	11%	5,6%	17,1%
Точечные	91	29,7%	21,4%	37,1%

В таблице 2 видно превалирование делеций в 59,3% (ДИ95%; 51,9-68,9%) случаях, чем дупликации и точечные мутации.

Превалирование делеций наблюдается во всех исследованиях, проводимых во многих странах, и колеблется в пределах 65%. Собственные данные в сравнительном аспекте приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Распределение мутаций гена *DMD* по странам с указанием размера выборки (2019–2024)

Страна	Делеции (%)	Дупликации (%)	Точечные мутации (%)	Размер выборки (n)	Источник
1	2	3	4	5	6
Индия	63	21	6	100	JCDR, 2022
Бангладеш	61.1	-	16.7	18	Nature, 2023
Бразилия	43.6	10.6	45.8	47	MDPI, 2023
Италия	71.2	9.7	14.9	47	MDPI, 2023
Гватемала	63.6	9.1	27.3	11	ResearchGate, 2024
Саудовская Аравия	67	13	20	30	FrontiersinNeurology, 2024
Южная Корея	67	14	18	65	PMC, 2021
США	~65	~10	~25	1000	PPMD Registry, 2023
Канада	~65	~10	~25	500	PPMD Registry, 2023
Япония	~65	~10	~25	200	DelveInsight, 2020
Германия	~65	~5–10	~25–30	150	DelveInsight, 2020
Франция	~65	~5–10	~25–30	150	DelveInsight, 2020
Испания	~65	~5–10	~25–30	150	DelveInsight, 2020
Австралия	~65	~10	~25	100	PPMD Registry, 2023
Китай	~60–65	~10–15	~20–25	300	Nature Reviews, 2021
Индонезия	69.8	11.6	~18	43	F1000Research, 2021
Колумбия	31	-	54	33	FrontiersinPharmacology, 2021

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6
Мексика	~60–65	~10	~25	100	Orphanet Journal, 2020
Египет	~60	~10–15	~25–30	52203	Nature Reviews, 2021
Южная Африка	~60	~10–15	~25	1000	Nature Reviews, 2021
Республика Казахстан	59,3	11	29,7	91	Собственные данные

Как видно из таблицы 3, полученные нами данные соответствуют результатам исследований с большей когортой выборки.

На следующем месте по частоте отмечаются точечные типы мутаций, тогда как дупликации составили 11% случаев среди всех типов мутаций (рисунок 6).

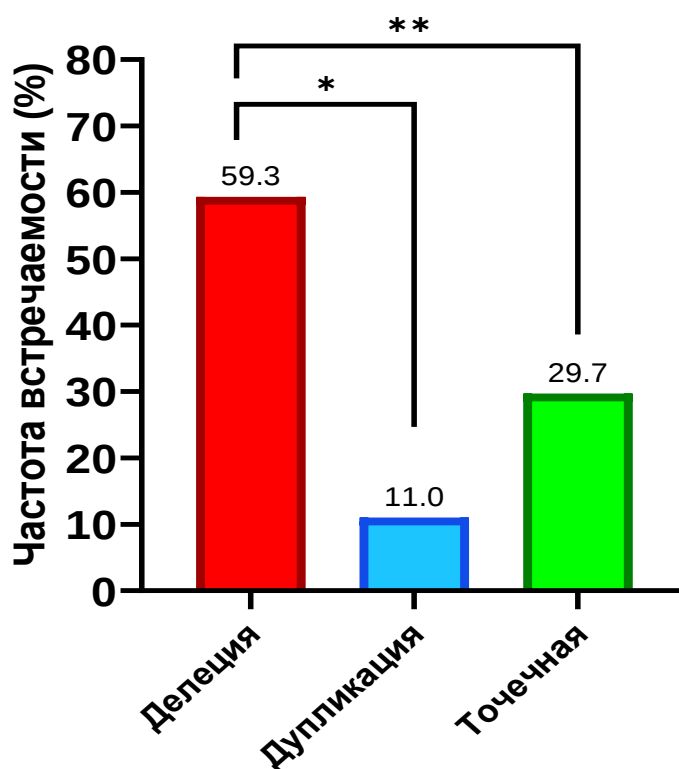


Рисунок 6 – Частота типа мутаций

На рисунке 6 показано, что среди крупных мутаций (делеции и дупликации) частота делеций существенно превышала.

В структуре 54 случаев делеций, потеря одного экзона отмечалась в 10 (18,5% 95%ДИ; 11,3-25,6) случаях, тогда как, протяженные делеции (потеря ≥ 2 экзонов) наблюдались в 44 (81,5% 95%ДИ; 77,4-86,1) случаях (таблица 4).

Таблица 4 – Структура делеционного спектра мутаций

Тип мутации	Общее количество	Выявленные	95% ДИ нижний	95% ДИ верхний
Одноэкзонная делеция	54	18,5%	11,3%	25,6%
Протяженные делеции	54	81,5%	77,4%	86,1%

В таблице 4 видно превалирование протяженных делеций в 81,5% (ДИ95%; 77,4-86,1) случаях.

Структура точечных мутаций распределена следующим образом: микроделеции – 4 (3,8%), микродупликации – 3 (2,8%), нонсенс мутации – 14 (13,2%), интронные мутации – 5 (4,7%), инсерции – 2 (1,9%), миссенс мутации – 1 (0,9%), комбинированная мутация – нонсенс и миссенс – 1 (0,9%) и микроделеция с инсерцией в 1 (0,9%) случаях из 31. При анализе структуры типов точечных мутаций исключили анализ мутаций сибсов, а именно 2 случая нонсенс мутаций, по 1 случаю микроделеции и интронной мутации (таблица 5).

Таблица 5 – Структура точечных мутаций

Тип мутации	Абсолютное количество	Процентное соотношение среди всех мутаций (n=91)	Процентное соотношение среди точечных мутаций (n=27)
Микроделеция	3	3,3%	11,1%
Микродупликация	3	3,3%	11,1%
Нонсенс мутация	12	13,2%	44,4%
Интронная мутация	4	4,4%	14,8%
Инсерция	2	2,2%	7,5%
Миссенс мутация	1	1,1%	3,7%
Нонсенс и миссенс	1	1,1%	3,7%
Микроделеция с инсерцией	1	1,1%	3,7%

В таблице 5 видно, что среди точечных мутаций превалировали нонсенс мутации.

Анализ мутаций в зависимости от расположения в гене *DMD* показал неравномерное распределение. В высокофункциональном актинсвязывающем участке гена мутации располагались в 55 (60,4%; 95%ДИ; 51,5-70,1) случаях, в центральном участке гена – 29 (31,9%; 95%ДИ; 23,9-40,1) и в участке, соединяющего ДГК – 7 (7,7%; 95%ДИ; 1,3-13,4) (таблица 6).

Таблица 6 – Частота мутаций в разрезе локализации в гене

Локализация	Общее количество	Выявленные	95% ДИ нижний	95% ДИ верхний
Актинсвязывающий участок	91	60,4%	51,5%	70,1%
Центральный участок	91	31,9%	23,9%	40,1%
Участок, соединяющий ДГК	91	7,7%	1,3%	13,4%

В таблице 6 видно превалирование мутаций в актинсвязывающем участке гена в 60,4% (95%ДИ; 51,5-70,1) случаях.

Анализ частоты каждого типа мутаций в зависимости от локализации представлен на рисунке 7.

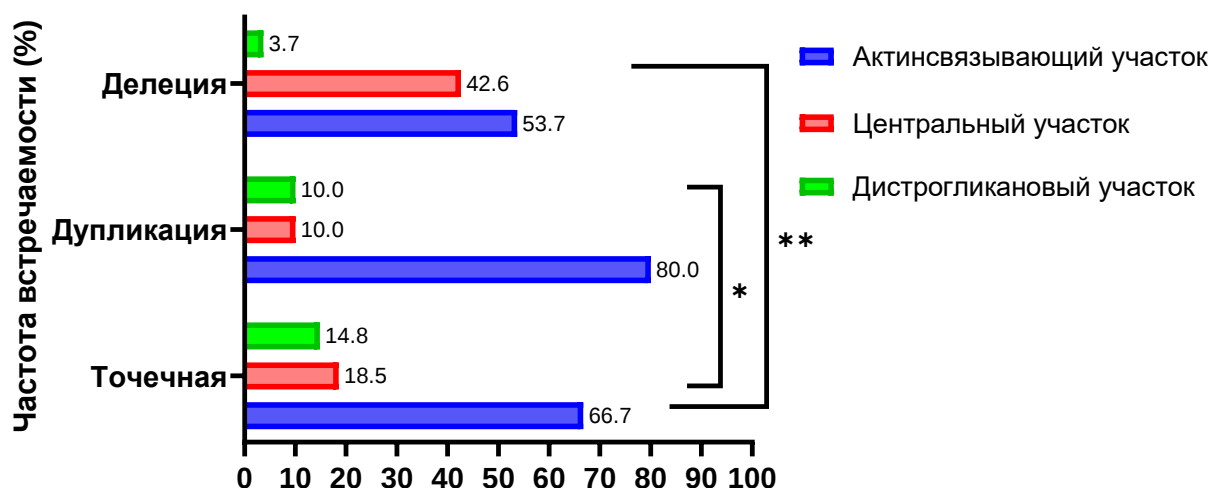


Рисунок 7 – Распределение типов мутаций и их локализация

Как видно из рисунка 7, все типы мутаций в большинстве случаев располагались в актинсвязывающем участке.

Анализ мутаций в зависимости от локализации показал, что делеции в актинсвязывающем участке регистрировались в 29 (53,7%), в центральном участке в 23 (42,6%) и в участке, соединяющий с ДГК, в 2 (3,7%) случаях из 54 случаев делеций, а дупликации в актинсвязывающем участке регистрировались в 8 (80%), в центральном участке в 1 (10%) и в участке, соединяющий с ДГК, в 1 (10%) случаях из 10 случаев дупликаций, тогда как точечные мутации в актинсвязывающем участке регистрировались в 18 (66,7%), в центральном участке в 5 (18,5%) и в участке, соединяющий с ДГК, в 4 (14,8%) случаях из 27 случая точечных мутаций (таблица 7).

Таблица 7 – Частота мутаций в разрезе локализации в гене

Типы мутаций	Локализация мутаций					
	Активсвязывающий участок (%)	95% ДИ	Центральный участок (%)	95% ДИ	Дистрогликановый участок (%)	95% ДИ
Делеция	53,7	44,5% - 62,2%	42,6	31,6% - 53,6%	3,7	1,1% - 7,2%
Дупликация	80,0	77,1% - 83,6%	10,0	5,6% - 16,1%	10,0	5,6% - 16,1%
Точечные	66,7	60,1% - 73,1%	18,5	11,2% - 25,5%	14,8	7,4% - 22,3%

Как видно в таблице 7, делеции в основном располагались в активсвязывающем и центральном участках гена, дупликации и точечные мутации также преобладали в активсвязывающем участке.

Оценка прогнозирования состояния трансляционной рамки считывания генетического кода показала: в 75 случаях (82,4%) из 91 рамка считывания сдвигается (нарушается), в 14 случаях (15,4%) – не нарушается, в 2 анализах (2,2%) прогнозировать не удастся (таблица 8).

Таблица 8 – Частота мутаций с оценкой трансляционной рамки считывания генетического кода

Группы	N	%	95% ДИ нижний	95% ДИ верхний
С нарушением рамки	75	82,4	72,3	92,1
Без нарушения рамки	14	15,4	11,2	19,3
Без прогноза	2	2,2	0,16	4,3

Как видно из таблицы 8, в 82,4% (95%ДИ; 72,3-92,1) случаях преобладали мутации, нарушающие трансляционную рамку считывания генетического кода. По результатам прогнозирования мутаций в нашей выборке нарушения трансляционной рамки считывания генетического кода не отмечалось в 14 (15,4%) случаев, тогда как в комбинированных точечных мутациях анализировать не удалось в 2 (2,2%) случаях.

Анализ нарушения и сохранения трансляционной рамки считывания генетического кода проведен в зависимости от расположения мутаций в гене. При оценке мутаций, расположенных в активсвязывающем участке, в 42 (76,4%) из 55 случаев отмечается нарушение рамки считывания; в 11 (20%) из 55 – рамка считывания не нарушалась. При оценке мутаций, расположенных в центральном участке гена, в 29 (100%) случаев из 29 отмечается нарушение

рамки считывания. При оценке мутаций, расположенных в участке, ответственного за присоединение дистрофин-гликопротеинового комплекса в 4 (57,1%) из 7 случаев отмечается нарушение рамки считывания; в 3 (42,9%) из 7 – рамка считывания сохранялась (таблица 9).

Таблица 9 – Анализ трансляционной рамки считывания генетического кода в зависимости от локализации

Типы мутаций	Локализация мутаций					
	Актинсвязывающий участок (%)	95% ДИ	Центральный участок (%)	95% ДИ	Дистрогликановый участок (%)	95% ДИ
РС со сдвигом	76,4	66,5% - 85,9%	100	-	57,1	51,6% - 62,5%
РС без сдвига	20,0	14,6% - 25,6%	0,0	-	42,9	36,4% - 49,8%
РС не определяется	3,6	1,1% - 6,8%	0,0	-	0,0	-

Как видно в таблице 9, мутации с нарушением рамки, преимущественно, располагались в актинсвязывающем (76,4%; 95%ДИ; 66,5-85,9) и центральном участках гена. Анализ мутаций, не нарушающих трансляционную рамку считывания генетического кода показал, что превалирование отмечается в участке гена, ответственного за присоединение ДГК, в меньшей степени в высокофункциональном актинсвязывающем участке гена, тогда как в центральном участке гена не наблюдались (рисунок 8).

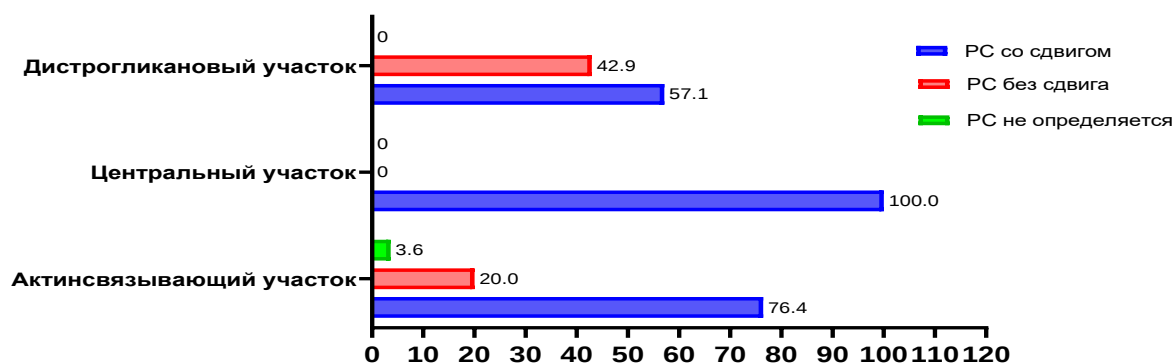


Рисунок 8 – Анализ трансляционной рамки считывания в зависимости от локализации мутаций (n=91), p<0,001

Как видно на рисунке 8, мутации, не приводящие к нарушению трансляционной рамки считывания генетического кода, в центральном участке частота достигла 100%, с частотой 57,1% (95%ДИ; 51,6-62,5), расположились в участке, ответственного за присоединение ДГК.

Таким образом, анализ спектра мутаций, показал превалирование крупных мутаций в виде делеций и дупликаций, при котором превалировали делеции. Среди делеционного спектра мутаций протяженные делеции составили 81,5% случаев. В структуре точечных мутаций превалировали нонсенс мутации. Мутации в большей степени располагались в высокофункциональном актинсвязывающем участке, нарушение трансляционной рамки считывания генетического кода наблюдалось в 82,4% случаев.

3.3 Клиническая характеристика миодистрофии Дюшенна

Клиническое (неврологическое) состояние детей с миодистрофией Дюшенна с оценкой тяжести состояния описаны согласно клиническому протоколу по стадиям заболевания: доклиническая; ранняя и поздняя амбулаторная; ранняя и поздняя неамбулаторная (рисунок 9).

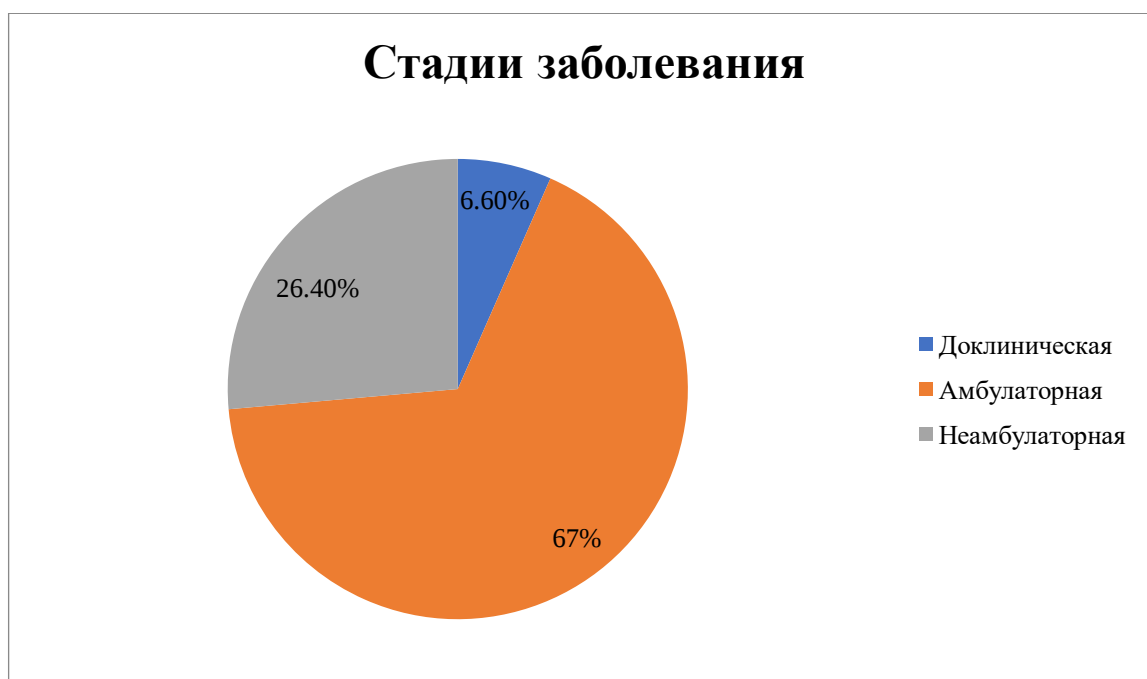


Рисунок 9 – Ранжирование детей с МДД по стадиям заболевания (n=106)

Как видно на рисунке 9, возможность самостоятельного передвижения (амбулаторный статус) отмечался у 71 (67%) из 106 детей и 28 детей (26,4%) имели статус неамбулаторности, тогда как у 7 (6,6%) детей клинических проявлений МДД не было (доклиническая стадия). Дети в доклинической стадии были сибсами мальчиков с МДД и диагностированы (генетически верифицированы) и без наличия клинических симптомов (до 2-х лет). Дальнейшая клиническая характеристика детей описывалась у 99 детей, имеющих клинические симптомы.

У всех детей с МДД уровень КФК в сыворотке крови превышал норму (145-150 ед/л) и отмечался в диапазоне 4000-12500 ед/л.

Из клинических характеристик учитывались средний возраст дебюта заболевания и постановки диагноза (генетически) (таблица 10).

Таблица 10 – Характеристика детей с миодситрофией Дюшенна

Показатель	Среднее	Стандартное отклонение	95% ДИ нижний	95% ДИ верхний
Возраст дебюта МДД (в годах)	3,7	0,09	3,68	3,72
Возраст постановки диагноза (генетически) (в годах)	5,4	0,09	5,38	5,42

Как видно из таблицы 10, средний возраст дебюта заболевания составил $3,7 \pm 0,09$ лет, тогда как диагноз верифицировался в $5,4 \pm 0,09$ лет (имеет место существенная задержка постановки диагноза).

Отдельно проводился анализ детей в амбулаторной стадии, в которой оценивались средний возраст, возраст наступления неамбулаторности и время от момента дебюта заболевания до наступления неамбулаторности (стаж амбулаторности) (таблица 11).

Таблица 11 – Возрастные показатели детей с МДД в амбулаторной и неамбулаторной стадии

Показатель	N	min	max	$\bar{x}$	STD	95% ДИ нижний	95% ДИ верхний
Возраст детей в амбулаторной стадии	71	1,9	15,1	4,5	1,12	4,25	4,75
Возраст наступления неамбулаторности	28	7,1	11,6	9,5	1,31	9,04	10,05
Стаж амбулаторности	28	2,1	8,7	5,8	1,72	5,16	6,5

Как видно в таблице 11, средний возраст детей амбулаторной стадии на момент первичного осмотра составил $4,5 \pm 1,12$ лет, показатель среднего возраста наступления неамбулаторной стадии – $9,5 \pm 0,51$ лет, стаж амбулаторности в среднем составил $5,8 \pm 1,72$ лет.

Таким образом, анализ клинических характеристик показывает, что клинические симптомы имелись у 99 детей, где описаны в соответствии стадиям заболевания. Имеет место поздней диагностики. Средний возраст

наступления неамбулаторности в нашей выборке был 9,5 лет (по литературным данным – 12 лет).

3.3.1 Клиническая характеристика миодистрофии Дюшенна с учётом типа мутаций

Проведен анализ по типу мутаций в трех группах детей, согласно стадиям заболевания. Ранжирование частоты типа мутаций 7 детей в доклинической стадии показало следующее: в 4 (57,1%) случаях обнаружена делеция, в 2 (28,6%) – дупликация и в 1 (14,3%) – точечные мутации. Ранжирование частоты типа мутаций 71 мальчика в амбулаторной стадии показало следующее: в 39 (54,9%) случаях была делеция, в 11 (15,4%) – дупликация и в 21 (29,7%) – точечные мутации. Ранжирование частоты типа мутаций 28 мальчика в неамбулаторной стадии показало следующее: в 18 (64,3%) случаях была делеция, в 1 (3,6%) – дупликация, в 9 (32,1%) – точечные мутации.

Средние уровни возраста наступления неамбулаторности у пациентов с миодистрофией Дюшенна при точечных мутациях, при делеции и при дупликации показаны в таблице 12.

Таблица 12 – Статистические характеристики исследуемых переменных у детей в разрезе типа мутации гена DMD

Переменные	N	Минимум	Максимум	Среднее арифм.		Стандартное отклонение
				X	m	
Точечные мутации						
Возраст наступления неамбулаторности	9	7,1	11,2	9,47	0,48	1,45
Делеция						
Возраст наступления неамбулаторности	18	7,2	11,6	9,56	0,31	1,31
Дупликации						
Возраст наступления неамбулаторности	1	10,1	10,1	10,10	-	-

Как видно из таблицы 12, средние уровни возраста наступления неамбулаторности у пациентов с миодистрофией Дюшенна при точечных мутациях составили $9,47 \pm 0,48$ лет, при делеции $9,56 \pm 0,31$ лет и при дупликации 10,10 лет. Причем, статистически достоверной разницы между групповыми средними по всем исследуемым переменным не обнаружено ($p \geq 0,05$).

Анализ связи показателей шкалы Vignos в разрезе типов мутаций показал одинаковое распределение уровня классов среди всех детей с МДД (рис. 10).

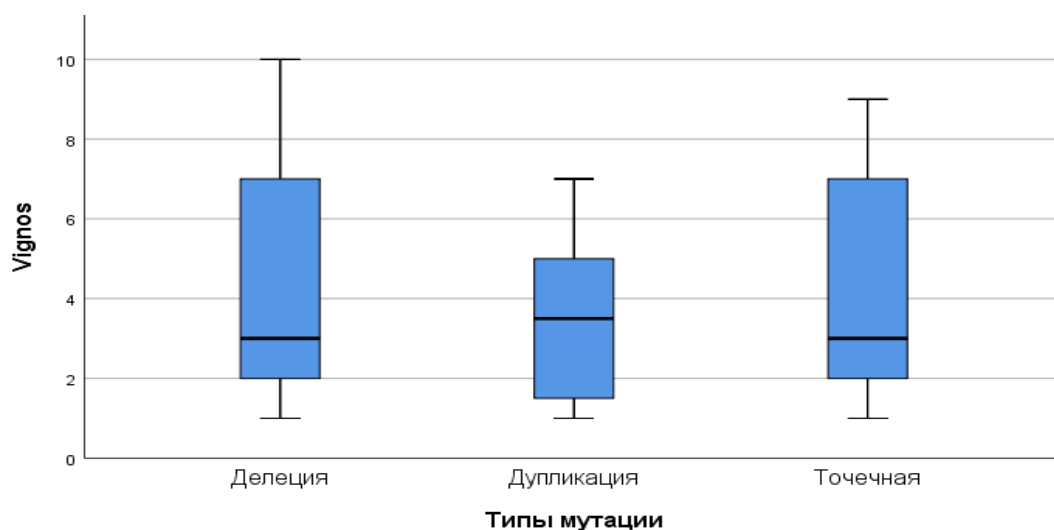


Рисунок 10 – Уровень классов шкалы Vignos в зависимости от типа мутаций (n=99), ($p \geq 0,05$)

На рисунке 10 видно, что оценка тяжести клинического состояния детей с МДД на основе типа мутаций является незначимой. Класс по шкале Vignos оценивался в зависимости от типа мутаций (таблица 13).

Таблица 13 – Статистические характеристики класса по шкале Vignos у детей в разрезе типа мутаций в гене DMD

Статистики		Шкала Vignos
Точечные мутации		
N	Значимые	31
	Пропущенные	0
X		3,74
Медиана		3,00
Мода		1
Делеция		
N	Значимый	61
	Пропущенные	0
X		3,80
Медиана		3,00
Мода		1
Дупликации		
N	Значимый	14
	Пропущенный	0
X		3,29
Медиана		2,50
Мода		1

Как видно в таблице 13, у детей с точечной мутацией и с делецией средний уровень классов занимал между 3 и 4 классами, а с дупликацией – между 2 и 3 классами. Статистически достоверной разницы между групповыми средними по всем исследуемым переменным не обнаружено ($p \geq 0,05$).

Следующим инструментом оценки моторных возможностей была шкала NSAA, с помощью которой описаны дети в амбулаторной и неамбулаторной стадиях. Средний балл по шкале NSAA у 71 амбулаторных детей составил $20,56 \pm 5,72$, тогда как у 28 неамбулаторных детей – $9,54 \pm 2,7$.

Ранжирование баллов по шкале NSAA в зависимости от типа мутаций у всех детей показало: в группе детей с делецией (57 детей) средний балл был $16,8 \pm 6,9$; в группе детей с дупликацией (12 детей) – $19,6 \pm 9,72$ и в группе детей с точечной мутацией (30 детей) – $16,7 \pm 6,9$ (рисунок 11).

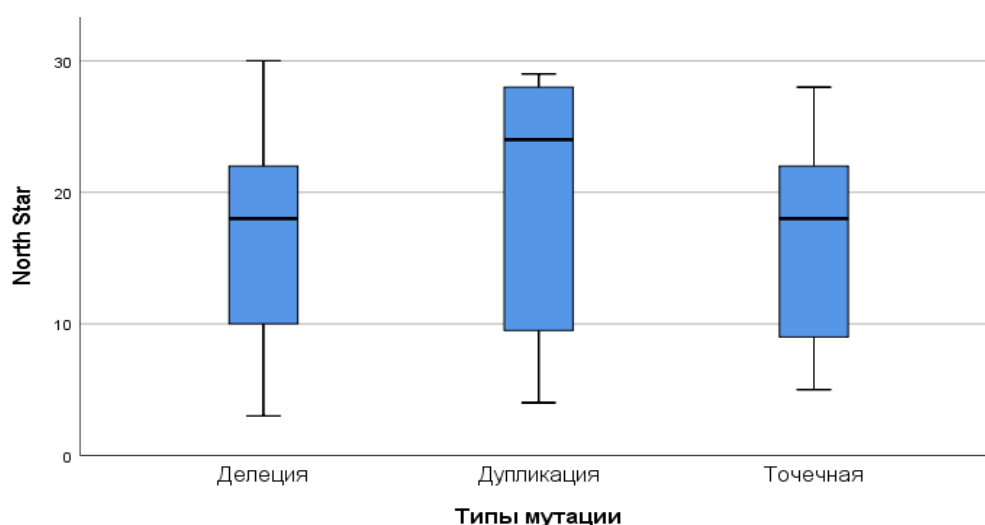


Рисунок 11 – Показатели шкалы NSAA в зависимости от типа мутаций ($n=99$), ($p \geq 0,05$)

Как видно из рисунка 11, анализ связи уровня средних баллов по шкале NSAA с типами мутаций не показал статистически значимого различия.

Анализ взаимосвязи среднего возраста дебюта заболевания в зависимости от типа мутаций показал следующее: в группе детей с делецией (57 детей) средний возраст дебюта был $3,53 \pm 0,93$ лет; в группе детей с дупликацией (12 детей) – $3,72 \pm 1,09$ и в группе детей с точечной мутацией (30 детей) – $3,73 \pm 0,92$ (рисунок 12).

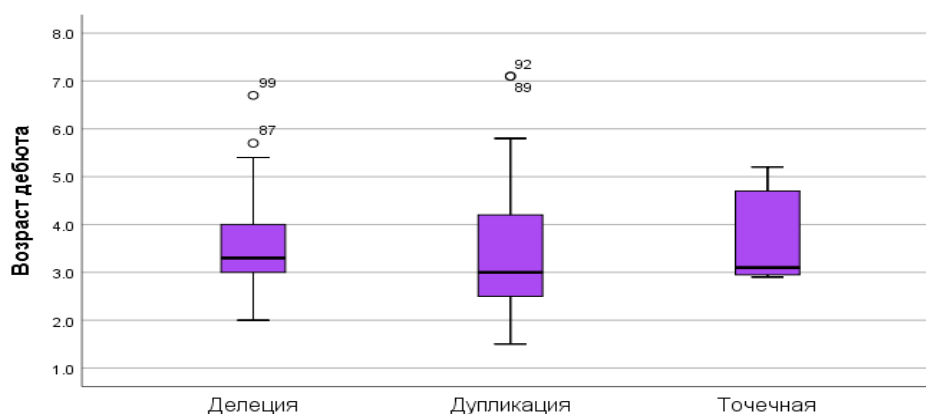


Рисунок 12 – Средний возраст дебюта заболевания в зависимости от типа мутаций (n=99), ($p \geq 0,05$)

Как видно из рисунка 12, анализ связи среднего возраста дебюта заболевания с типами мутаций (делеции, дупликации, точечные мутации) не показал статистически значимого различия.

Анализ связи возраста дебюта заболевания с состоянием трансляционной рамки считывания генетического кода показал, что у детей с мутацией с нарушением рамки средний возраст дебюта наступил ранее, чем при мутации без нарушения (таблица 14).

Таблица 14 – Взаимосвязь возраста дебюта заболевания от состояния трансляционной рамки считывания генетического кода

Группы	Показатель	$\bar{x}$	STD	95%ДИ нижний	95%ДИ верхний
С нарушением рамки	Возраст дебюта	2,95	0,25	2,90	3,00
Без нарушения рамки	Возраст дебюта	4,77	0,5	4,67	4,87

По результатам таблицы 14 видно, что при нарушении трансляционной рамки считывания генетического кода дебют заболевания наступил ранее в $2,95 \pm 0,25$ лет. При случае сохранения трансляционной рамки считывания генетического кода дебют заболевания наступил позднее в $4,77 \pm 0,5$ лет (рисунок 13).

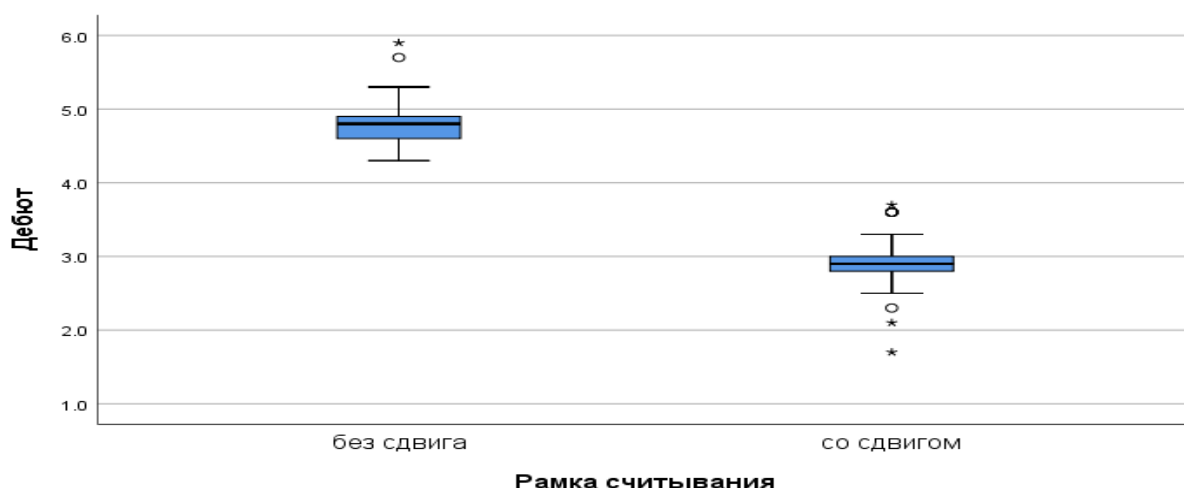


Рисунок 13 – Средний возраст дебюта заболевания в зависимости от состояния трансляционной рамки считывания генетического кода (n=99)

Как видно на рисунке 13, получены статистически значимые различия, где у детей с нарушением трансляционной рамки считывания дебют заболевания был раньше, чем у детей без нарушения рамки считывания ($p < 0,05$).

Оценка влияния состояния трансляционной рамки считывания генетического кода на моторные возможности у амбулаторных детей (71 детей) производилась путем применения шкалы NSAA (таблица 15).

Таблица 15 – Показатели шкалы NSAA в зависимости от состояния трансляционной рамки считывания генетического кода

Показатель	N	min	max	$\bar{x}$	STD	95% ДИ нижний	95% ДИ верхний
С нарушением рамки	57 (80,3%)	3	26	15	5,6	13,55	16,45
Без нарушения рамки	14 (19,7%)	8	30	25	8,7	19,98	30,02

Как видно в таблице 15, трансляционная рамка считывания была нарушена в 57 (80,3%) случаях, сохранена – в 14 (19,7%) случаях. Оценка по средним значениям показала, что $15 \pm 5,6$ и $25 \pm 8,7$ баллов было у детей с нарушением и без нарушения трансляционной рамки считывания, соответственно (рисунок 14).



Рисунок 14 – Средний балл по шкале NSAA у амбулаторных детей в зависимости от состояния трансляционной рамки считывания (n=71), ($p<0,05$)

Как видно из рисунка 14, продемонстрировано, что у детей с мутацией с нарушением рамки считывания средний балл шкалы NSAA был низким $15 \pm 5,6$, тогда как у детей с мутациями без нарушения рамки считывания моторные функции были сравнительно сохранены (средний балл по шкале NSAA – $25 \pm 8,7$).

Следующим инструментом оценки моторных возможностей у амбулаторных детей был временной тест шестиминутной ходьбы (6MWT), результаты анализа которого оценивались в зависимости от состояния трансляционной рамки считывания генетического кода. Данный анализ показан в таблице 16.

Таблица 16 – Показатели теста 6MWT в зависимости от состояния трансляционной рамки считывания генетического кода

Показатель	N	min	max	$\bar{x}$	STD	95% ДИ нижний	95% ДИ верхний
С нарушением рамки	57	110	537	292,4	11,3	289,47	295,33
Без нарушения рамки	14	125	550	391,6	16,2	382,25	400,95

В таблице 16 показан сравнительный анализ результата теста 6MWT: у детей при мутации с нарушением рамки считывания значение пройденного расстояния ниже, чем у детей с мутацией без нарушения рамки считывания. По результатам теста шестиминутной ходьбы (6MWT) у амбулаторных (71 детей) детей, у которых мутация была с нарушением рамки считывания (57 детей), значение пройденного расстояния в метрах составило $292,4 \pm 11,3$ метров, напротив $391,6 \pm 16,2$ метров у 14 детей, при мутациях без нарушения рамки считывания (рисунок 15).

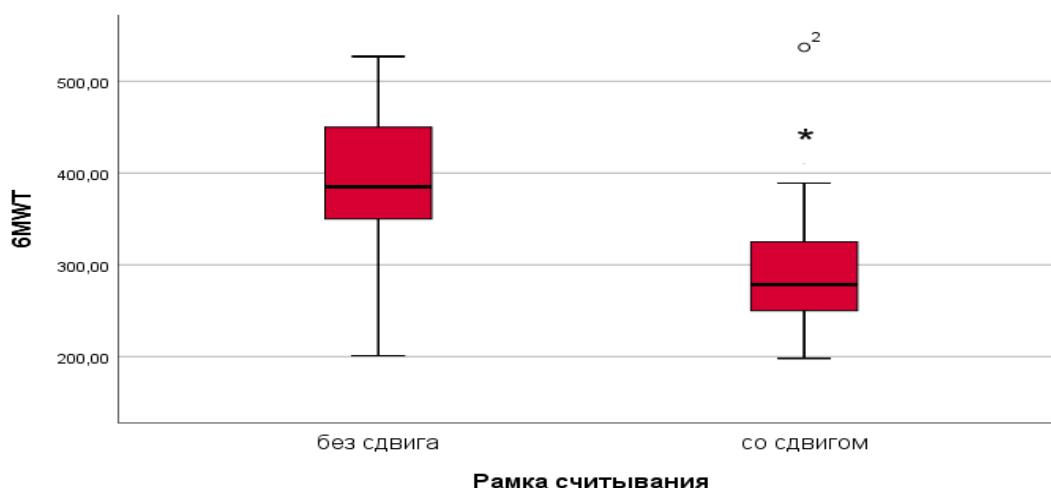


Рисунок 15 – Оценка анализа взаимосвязи результатов теста 6-ти минутной ходьбы в зависимости от состояния рамки считывания у амбулаторных детей (n=71)

Примечание - * - $p < 0,001$ – статистически значимые различия по критерию Манна-Уитни

На рисунке 15 показаны полученные статистические различия ($p < 0,001$) между пройденным расстоянием в тесте 6MWT у детей при мутациях с нарушением и без нарушения трансляционной рамки считывания.

Таким образом, анализ клинических данных с учетом типа мутаций показал, что статистически достоверные взаимосвязи клинически значимых критериев, таких как возраст дебюта заболевания, возраст наступления неамбулаторности, моторные возможности у амбулаторных и неамбулаторных пациентов, демонстрируются при использовании результатов не от типа мутаций, а от их функциональных характеристик, таких как состояние трансляционной рамки считывания генетического кода и от расположения мутаций в гене *DMD*.

3.3.1.1 Оценка клинических характеристик детей с МДД через 12 месяцев

В этот период оценки 18 (25,3%) из 71 амбулаторных детей стали неамбулаторными, тем самым неамбулаторные дети составили 46; амбулаторные – 53; в доклинической стадии – 7 детей.

Для оценки влияния состояния трансляционной рамки считывания генетического кода на динамику моторных функций анализировали только амбулаторных детей (53 пациентов). Для оценки был применен временной тест шестиминутной ходьбы (6MWT). Для достоверности результатов мы оценивали среди амбулаторных 53 детей, пациентов, находящихся на одинаковой функциональной стадии заболевания (ранняя амбулаторная стадия), в количестве 45 пациентов, среди которых в 33 случаях отмечались мутации с нарушением рамки считывания, тогда как у 12 – рамка считывания не нарушалась. Данный анализ показан в таблице 17.

Таблица 17 – Динамика показателей теста 6MWT в зависимости от состояния трансляционной рамки считывания генетического кода у детей в ранней амбулаторной стадии

Показатель	N	min	max	$\bar{x}$	STD	95% ДИ нижний	95% ДИ верхний
С нарушением рамки на момент первичного осмотра	33	110	537	314,2	3,17	313,12	315,28
С нарушением рамки через 12 мес.	33	95	503	285,8	3,12	284,74	286,86
Без нарушения рамки на момент первичного осмотра	12	12	125	450,7	3,09	448,74	452,66
Без нарушения рамки через 12 мес.	12	12	175	437,5	3,22	435,45	439,55

В таблице 17 показан анализ результатов теста 6MWT через 12 месяцев, при котором пройденное расстояние составило $285,8 \pm 3,12$ метров при мутации с нарушением рамки считывания, тогда как при сохранении рамки считывания – $437,5 \pm 3,22$ метров.

Сравнительный анализ показывает, что у детей с мутацией с нарушением трансляционной рамки считывания генетического кода пройденное расстояние снизилось с $314,2 \pm 3,17$ на $285,8 \pm 3,12$ метров, тогда как при сохранении рамки считывания снижение отмечалось с $450,7 \pm 3,09$ метров до $437,5 \pm 3,22$ (рисунок 16).

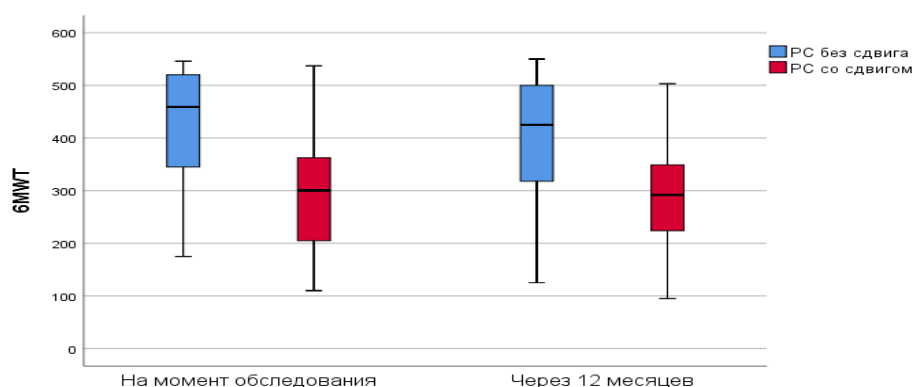


Рисунок 16 – Анализ взаимосвязи результатов теста 6MWT в зависимости от состояния рамки считывания у амбулаторных детей через 12 месяцев (n=45)

Как видно из рисунка 16, у пациентов с нарушением трансляционной рамки считывания наблюдается значительное снижение моторных функций.

Для изучения влияния состояния трансляционной рамки считывания генетического кода на длительность сохранения самостоятельной ходьбы был проведен анализ Каплана Майера, который показал, что у детей при мутациях с нарушением рамки считывания генетического кода длительность сохранения самостоятельной ходьбы был $3,9 \pm 0,26$, при ее сохранении – $5,3 \pm 0,19$ лет (таблица 18).

Таблица 18 – Сравнение безрецидивной выживаемости детей с наличием неамбулаторности в зависимости от факторов риска

Фактор риска	Категория	Срок дожития, год.	p
		Me±SE [95% ДИ]	
Рамка считывания	Положительная	3,9±0,26 [3,38-4,42]	0,001
	Отрицательная	5,3±0,19 [4,93-5,67]	
Примечание - * влияние фактора на безрецидивную выживаемость статистически значимо (p=0,001)			

Как видно в таблице 18, более длительный срок сохранения возможности самостоятельной ходьбы в течение $5,3 \pm 0,19$ лет отмечается при сохранении трансляционной рамки считывания, чем $3,9 \pm 0,26$ лет – при ее нарушении.

Длительность сохранения самостоятельной ходьбы означает время от момента дебюта клинических проявлений МДД до наступления неамбулаторности, анализ в зависимости состояния трансляционной рамки считывания генетического кода показал достоверную разницу между группами (рисунок 17).

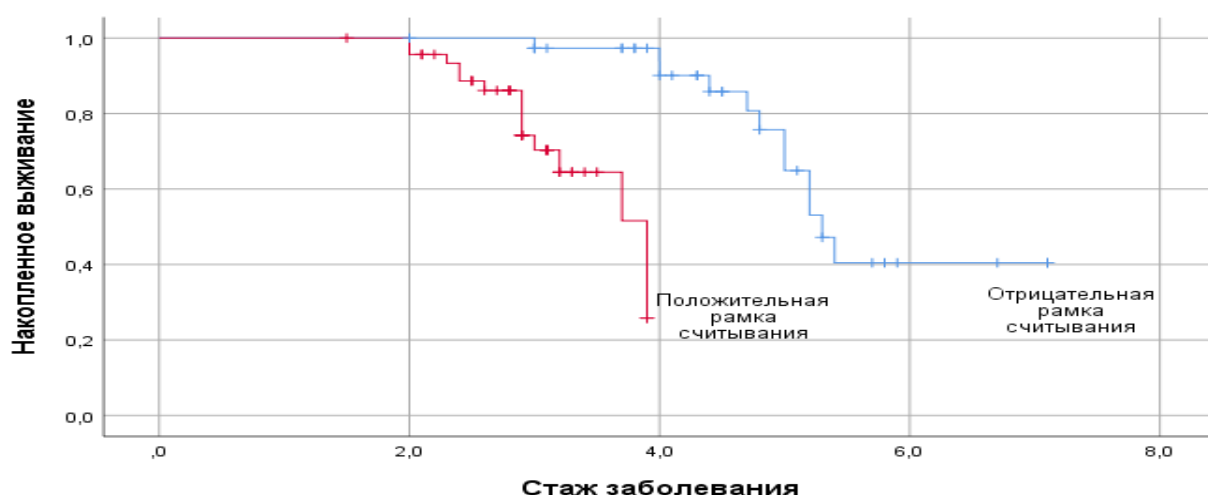


Рисунок 17 – Анализ сроков наступления неамбулаторности в зависимости от состояния трансляционной рамки считывания

Как видно на рисунке 17, при нарушении трансляционной рамки считывания неамбулаторность наступает раньше, чем при мутациях с сохраненной рамкой считывания.

Для оценки влияния состояния рамки считывания мутации, фактического возраста ребенка и возраста дебюта заболевания на наступление неамбулаторности проведен многофакторный анализ логистической регрессии.

Нами была разработана прогностическая модель для определения вероятности статуса неамбулаторности у детей с миодистрофией Дюшенна в зависимости от факторов методом бинарной логистической регрессии.

Полученная регрессионная модель является статистически значимой ($p < 0,001$). Исходя из значения коэффициента детерминации Найджелкерка, 59,2% дисперсии вероятности статуса неамбулаторности у детей с миодистрофией Дюшенна определяются факторами, включенными в модель.

Исходя из значений регрессионных коэффициентов, фактический возраст ребенка, возраст дебюта заболевания, а также состояния рамки считывания имели прямую связь с вероятностью выявления статуса неамбулаторности: т.е. увеличение возраста на 1 год – увеличивает шансы иметь статус неамбулаторности в 1,8 раз (95%ДИ: 1,40 – 2,34), возраст дебюта заболевания увеличивает в 5,31 раза (95%ДИ: 2,74 – 10,3) и нарушение рамки считывания в 12,362 раза (95%ДИ: 2,51 – 22,18). Характеристики каждого из факторов представлены в таблице 19.

Таблица 19 – Анализ логистической регрессии с вероятностью выявления статуса неамбулаторности

Предикторы	Нескорректированный		Скорректированный	
	ОШ; 95% ДИ	р	ОШ; 95% ДИ	р
Фактический возраст ребенка	1,01; 0,98-1,05	0,431	1,816; 1,407-2,344	<0,001*
Возраст дебюта заболевания	5,84; 2,73-12,46	<0,001*	5,31; 2,74-10,3	0,008*
Состояние рамки считывания	1,73; 0,92-3,24	0,253	12,362; 2,51-22,184	0,047*
Примечание - * влияние предиктора статистически значимо ($p < 0,05$)				

По данным таблицы 19 видно, что наиболее высокий риск потери амбулаторности в 12,36 раз (95%ДИ: 2,51 – 22,18) отмечается при факторе оценки состояния рамки считывания (нарушение рамки) мутации.

На рисунке 18 сопоставлены значения скорректированного отношения шансов с 95% ДИ для изучаемых факторов, вошедших в модель.

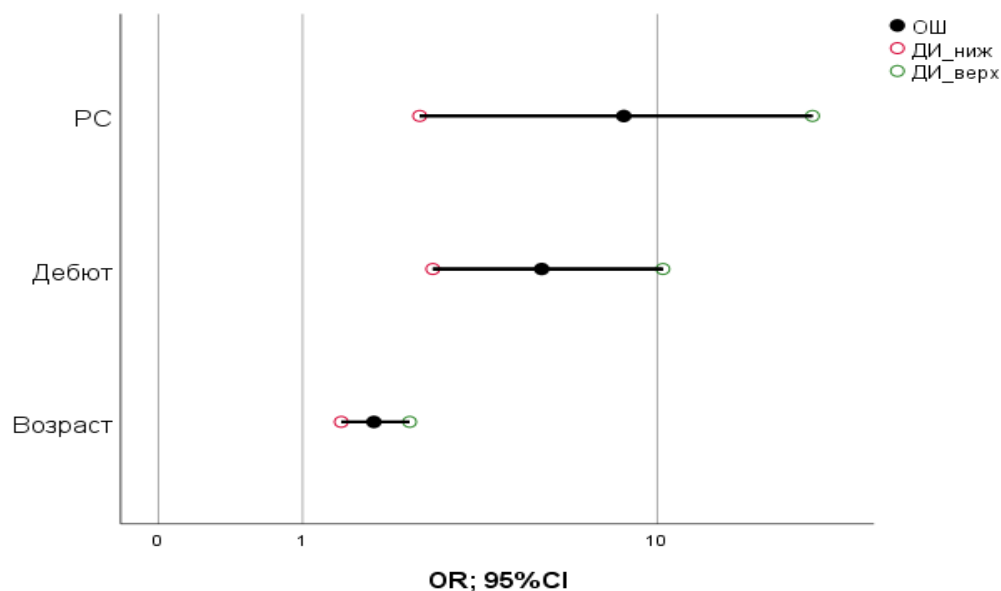


Рисунок 18 – Оценки отношения шансов с 95% ДИ для изучаемых предикторов выявления статуса неамбулаторности у детей с миодистрофией Дюшенна

По данным рисунка 18, наиболее высокий риск наступления неамбулаторности выявлен при наличии факторов возраста дебюта и нарушения рамки считывания генетического кода, с преимущественным влиянием последнего.

3.3.2 Клиническая характеристика миодистрофии Дюшенна с учётом вида терапии

Основу терапии МДД вне зависимости от типа мутаций составляет ГКС терапия, частым возрастом инициации составляет старше 4-х лет. Оценка воздействия ГКС терапии на моторные функции проводилась на момент осмотра и через 12 месяцев с учетом стадии заболевания: были сформированы группы пациентов, соответствующие ранней амбулаторной и ранней неамбулаторной стадиям. Из 45 детей на ранней амбулаторной стадии 13 детей получали таргетную терапию препаратом Аталурен (Трансларна) и в этой связи не анализировались в отношении оценки влияния ГКС на клиническую характеристику в катamnестическом наблюдении. Средний возраст анализируемых 32 детей составил $6,14 \pm 0,84$ лет, среди которых принимали ГКС терапию 25 (78,1%) детей; не принимали – 7 детей (21,9%). Для оценки моторных функций был использован тест 6MWT. Данный анализ показан в таблице 20.

Таблица 20 – Сравнительный анализ оценки влияния ГКС терапии на моторные функции с применением теста 6MWT (в метрах) при длительном наблюдении

Показатель	N	min	max	$\bar{x}$	STD	95% ДИ нижний	95% ДИ верхний
Дети, принимающие ГКС терапию (на момент первичного осмотра)	25	125	325	317,4	12,5	312,21	322,59
Дети, принимающие ГКС терапию (через 12 мес.)	25	136	507	348,1	9,65	344,12	352,08
Дети, не принимающие ГКС терапию (на момент первичного осмотра)	7	110	550	319,8	13,0	307,71	331,89
Дети, не принимающие ГКС терапию (через 12 мес.)	7	95	546	324,4	8,23	316,79	332,01

В таблице 20 показано, что в двух группах изменение пройденного расстояния неравномерное, а именно увеличился от $317,4 \pm 12,57$ метров до $348,1 \pm 9,65$ у детей, принимающих ГКС терапию и от $319,8 \pm 13,07$ до $324,4 \pm 8,23$ метров, у детей, не принимающих ГКС терапию. Увеличение пройденного расстояния наблюдалось в обеих группах детей (принимающих и не принимающих ГКС терапию), с преобладанием у первых (рисунок 19).

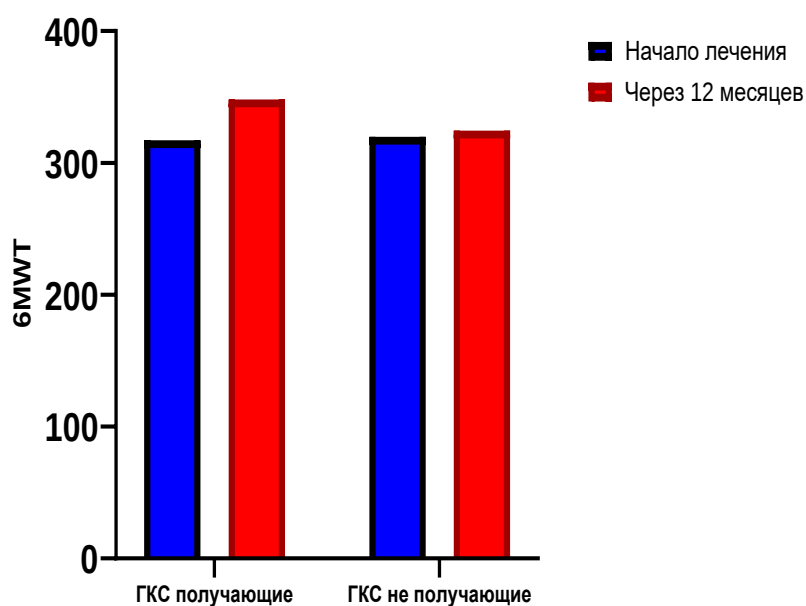


Рисунок 19 – Сравнительный анализ взаимосвязи результатов теста 6-ти минутной ходьбы в зависимости от ГКС терапии у амбулаторных детей (n=32)

Данные, представленные на рисунке 19, свидетельствуют о положительном влиянии ГКС терапии на моторные функции пациентов.

Аналогично оценивались моторные функции у детей с ранее неамбулаторной стадией (21 детей). Был применен временной тест «подъем с положения лежа». Данный тест оценивали перед началом получения ГКС терапии и через 12 месяцев. Средний возраст 21 детей на ранней неамбулаторной стадии составил $8,98 \pm 0,94$ лет. Глюкокортикостероидную терапию принимали 12 (57,1%) детей; не принимали – 9 детей (42,9%). Данные представлены в таблице 21.

Таблица 21 – Сравнительный анализ оценки влияния ГКС терапии на моторные функции в ранней неамбулаторной стадии с применением временного теста «подъем с положения лежа» (в секундах) при длительном наблюдении

Показатель	N	min	max	$\bar{x}$	STD	95% ДИ нижний	95% ДИ верхний
1	2	3	4	5	6	7	8
Дети, принимающие ГКС терапию (на момент первичного осмотра)	12	4	18	12	2,45	10,44	13,56

Продолжение таблицы 21

1	2	3	4	5	6	7	8
Дети, принимающие ГКС терапию (через 12 мес.)	12	4	17	17	2,18	15,61	18,39
Дети, не принимающие ГКС терапию (на момент первичного осмотра)	9	3	25	13	3,54	10,28	15,72
Дети, не принимающие ГКС терапию (через 12 мес.)	9	3	28	24	3,68	21,17	26,83

По данным таблицы 21, показатели ухудшились в обеих группах, получающих и не получающих ГКС терапию, преимущественно во второй группе: с $12 \pm 2,45$ сек. до $17 \pm 2,18$ сек. и с $13 \pm 3,54$ сек. до $24 \pm 3,68$ сек., соответственно.

В нашем исследовании нонсенс мутация была зарегистрирована у 14 детей, 13 из которых имели ранний амбулаторный статус, 1 – был в поздней амбулаторной стадии. Согласно типу мутации (нонсенс мутация) дети получали таргетную специфическую терапию препаратом Аталурен (трансларна), который предназначен исключительно для данного типа мутаций. Оценке влияния терапии препаратом Аталурен (Трансларна) на клинические исходы проводилась до начала терапии и через 12 месяцев для 13 детей в ранней амбулаторной стадии с применением теста 6MWT (таблица 22).

Таблица 22 – Сравнительный анализ оценки влияния препарата Трансларна на моторные функции в ранней амбулаторной стадии с применением временного теста 6MWT динамическом наблюдении

Показатель	N	$\bar{x}$	95% ДИ нижний	95% ДИ верхний
До терапии	13	327,4	319,7	334,3
Через 12 мес.	13	349,1	345,35	354,65

По данным таблицы 22, показатели составили $349,1 \pm 2,65$ метров при оценке через 12 месяцев (до терапии был $327,4 \pm 2,57$ метров).

Наблюдается незначительное изменение показателей теста 6MWT в динамике (рисунок 20).

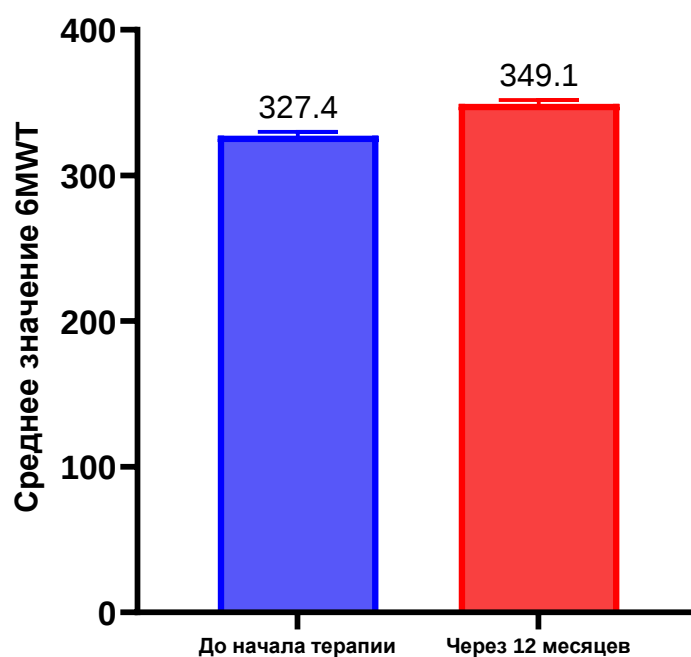


Рисунок 20 – Сравнительный анализ результатов теста 6-ти минутной ходьбы у детей, принимающих препарат Аталурен (Трансларна), n=13

Как видно на рисунке 20, показатели улучшились у детей, принимающих препарат Аталурен (Трансларна). Согласно данным инструкции препарата ожидается продление амбулаторности на 5,4 года, в сравнении с естественным течением, а данные представленные нами отражают только за 12 месяцев.

Обсуждение

В данной диссертационной работе представлены результаты клинико-генетических исследований миодистрофии Дюшенна в Республике Казахстан. Исследование охватывает основные вопросы о распространенности заболевания, молекулярно-генетической диагностики, особенностей клинического течения и современных терапевтических стратегий.

Согласно результатам проведенного исследования, частота встречаемости заболевания в Казахстане демонстрирует показатель 1 случай на 3311 детей мужского пола, что не противоречит имеющимся данным в мире [140]. Принципиальным аспектом оптимизации медицинской помощи является необходимость создания и поддержания функционирования национального регистра пациентов с МДД, что обеспечит возможность проведения высокоточного эпидемиологического мониторинга и повысит доступность современных диагностических процедур, который является стандартом оказания помощи в других странах [141,142]. Систематический анализ данных регистрационных систем предоставят возможность детерминировать истинную распространенность заболевания и способствует разработке оптимальных терапевтических стратегий и программ медико-социальной поддержки пациентов [49,р. 1673].

Полученные в ходе исследования данные подтверждают ключевую значимость молекулярно-генетического анализа в подтверждении диагноза миодистрофии Дюшенна. Согласно полученным данным, преобладающее большинство патогенных мутаций в гене *DMD* ассоциировано с крупными перестройками – делециями и дупликациями экзонов, что коррелирует с результатами многоцентровых международных исследований [73,р.97]. Современные молекулярно-генетические методы, включающие MLPA и NGS анализ, обеспечивают высокоточную идентификацию мутаций, что имеет определяющее значение для персонализированного подхода к терапии. MLPA демонстрирует оптимальное соотношение cost-effectiveness при скрининге мутаций в этом гене, в то время как пациенты с отрицательными результатами MLPA-анализа требуют проведения секвенирования всего гена для детекции точковых мутаций, таких как инсерции, делеции и миссенс мутации [85,р.288].

Молекулярно-генетический профиль МДД характеризуется преимущественно патогенными вариантами в гене дистрофина, который кодирует синтез белка, играющего критическую роль в поддержании структурной и функциональной целостности сарколеммы мышечных волокон. Примечательно, что приблизительно 91% идентифицированных мутаций соответствует правилу рамки считывания, что детерминирует синтез нефункционального усеченного белка дистрофина с последующей прогрессирующей дегенерацией мышечной ткани [32,р.1006]. В аспекте генетической гетерогенности заболевания проведенные исследования позволили выявить широкий спектр структурных вариаций, включая делеции и дупликации различной протяженности, которые обуславливают значительную фенотипическую вариабельность и градации клинической манифестации заболевания. В рамках настоящего исследования наиболее часто

регистрируемыми мутациями явились протяженные делеции, что демонстрирует высокую степень конкордантности с ранее опубликованными данными международных исследований [89,р.669].

В нашем исследовании на основе результатов MLPA анализа и секвенирования гена идентифицированы 91 различных мутаций, в структуре которых превалировали крупные делеции, чем дупликации, тогда как точечные мутации отмечались в треть случаев (59,3%, 10,9% и 29,7%, соответственно), что согласуется с данными зарубежных коллег [80,р.934].

Делеции (потеря экзонов) могут затрагивать один экзон или два и более экзонов, последний из которых называется протяженные делеции, что существенно оказывает влияние на выработку дистрофина. В нашем исследовании протяженные делеции составили 81,5%.

Особое внимание следует уделить различиям в спектре мутаций, выявленных в нашем исследовании, в сравнении с данными, представленными иранскими коллегами, в нашей работе преобладали протяженные делеции, в то время как в их данных, основная часть мутаций была сосредоточена в области 45-52 экзонов. Эти различия могут вносить вклад в наблюдаемую вариативность клинической картины заболевания [143].

Ключевым фактором, определяющим влияние мутации на синтез дистрофина, является наличие или отсутствие сдвига трансляционной рамки считывания. Нарушение трансляционной рамки считывания приводит к существенному снижению уровня дистрофина, что напрямую коррелирует с тяжестью клинических проявлений заболевания. Таким образом, оценка влияния мутации на рамку считывания имеет первостепенное значение для прогнозирования клинического течения заболевания. В нашем исследовании в 82,4% случаев мутации нарушали эту рамку, среди которых превалировали делеции. Такие же данные были получены рядом исследователей, где частота нарушения трансляционной рамки считывания составила в 85,2% для всех случаев и приводило к значительному ухудшению моторных функций и ускоренному прогрессированию заболевания [143].

Функциональное воздействие мутаций на синтез дистрофина определяется не только типом мутаций, но и их расположением в гене, так как *DMD* ген содержит несколько активных функциональных участков, наиболее изученными являются, ответственные за соединение с актином и дистрофин-гликопротеиновым комплексом, также функционально значим и центральный участок гена [36,р.265].

В нашей работе, при анализе результатов расположения мутаций в зависимости от состояния рамки считывания выявил, что мутации с нарушением рамки считывания в 76,4% случаях наблюдались в актинсвязывающем, в 100% случаях в центральном и в 57,1% в участке, ответственного за присоединение дистрофин-гликопротеинового комплекса, что отражаются в результатах работ Kyrychenko V. и Gatto F. и их соавторов [144,145].

Проведенный нами анализ логистической регрессии выявил, что мутации, локализованные в актинсвязывающем и центральном участках, увеличивают

риск нарушения трансляционной рамки считывания в 13,8 раз (95%ДИ: 2,45-77,4), что свидетельствует о высокой прогностической значимости их расположения.

От расположения мутаций по длине гена может зависеть гетерогенность клинических проявлений заболевания и расположение в проксимальной части гена (актинсвязывающий участок) может указывать на сложный и гетерогенный характер заболевания (Gholamreza Zamani и соавторов), полученные нами данные находят согласованность с их результатами в отношении частоты мутаций в этом участке (в 61,3% случаев) [146].

Клинический фенотип МДД характеризуется прогрессивным течением с неуклонно прогрессирующей дегенерацией мышечной ткани и развитием полиорганных осложнений, которые оказывают существенное негативное влияние на качество жизни и социальную адаптацию пациентов. Данная нозологическая форма, этиологически детерминированная патогенными вариантами в гене дистрофина, манифестирует преимущественно в раннем детском возрасте (2-5 лет) с развитием прогрессирующей мышечной слабости, при этом большинство пациентов утрачивают способность к самостоятельному передвижению (потери амбулаторности) в возрасте 12 лет [38, р.3738]. В нашей работе мы получили данные, в основном согласующие со многими исследованиями, при котором средний возраст дебюта заболевания составил $3,7 \pm 0,09$ лет, а показатель среднего возраста потери возможности самостоятельной ходьбы отличался и оценивался как ранняя потеря ($9,5 \pm 0,51$ лет). В нашей работе на момент генетической верификации диагноза в неамбулаторной стадии находились 28 детей, при катamnестическом наблюдении (за 12 месяцев) еще 18 детей утратили амбулаторность.

Анализ моторных возможностей (амбулаторность и неамбулаторность) в зависимости от типа мутаций показал превалирование делеций у амбулаторных и неамбулаторных детей в 54,9% и 64,3%, соответственно, что согласуется с результатами Flanigan K.M. и соавторов [147].

Результаты нашей работы в отношении моторных возможностей в зависимости от типов мутаций показывают аналогичные данные с результатами исследований, проведенных McDonald и van den Bergen J.C. и соавторов, свидетельствующие о том, что тип мутации оказывает незначительное влияние на степень моторных нарушений [148].

В этой связи, более актуальным является изучение функциональных характеристик мутаций, таких как состояние рамки трансляции и локализация мутаций, которые более существенно влияют на основные клинические характеристики, таких как возраст проявления первых симптомов, возраст потери амбулаторности, то есть на характер течения и скорость прогрессирования заболевания. В нашей работе у детей с мутациями, нарушающими рамку считывания, средний возраст дебюта заболевания составил $2,95 \pm 0,25$ года, напротив $4,77 \pm 0,5$ лет, детей с мутациями с сохраненной рамкой, что согласуется с данными Nicolas и соавторов [149].

Наши данные по оценке моторных функций у амбулаторных детей шкалой NSAA и тестом 6MWT, при мутациях с нарушением рамки считывания,

выявлены более низкие функциональные показатели ($15 \pm 5,6$ баллов и $292,4 \pm 11,3$ метров, соответственно) в сравнении данными детей с мутациями с сохраненной рамкой ($25 \pm 8,7$ баллов и $391,6 \pm 16,2$ метров, соответственно), что объясняется синтезом частично функционального белка дистрофина. Это подтверждается данными Nicolas и vandenBergen и их соавторов [148, р.747].

Через 12 месяцев наблюдения 25,3% детей, ранее амбулаторных, стали неамбулаторными, при этом наиболее значимым фактором риска потери амбулаторности оказалось нарушение трансляционной рамки считывания (ОР = 12,36; 95%ДИ: 2,51-22,18). Результаты анализа по Каплану-Майеру показали, что средняя продолжительность самостоятельного передвижения у детей с момента дебюта заболевания с сохраненной рамкой считывания была $5,3 \pm 0,19$ лет, тогда как у детей со сдвигом рамки – $3,9 \pm 0,26$ лет ($p=0,001$). Полученные данные подтверждают прогностическую значимость оценки состояния рамки считывания.

Определение типа мутации наряду с определением ее характеристик предоставляет возможность понимания сути и применения мутационно-специфической терапии, которая, на сегодняшний день, является бурно развивающимся направлением. На сегодняшний день используемые и экспериментальные терапевтические стратегии основаны на функциональных характеристиках мутаций этого гена.

Создание надёжных критериев оценки результатов для МДД способствовало совершенствованию методологии проведения клинических испытаний новых препаратов, которые способствуют в основном уменьшению дистрофических изменений в мышцах и восстановлению экспрессии дистрофина [150]. Уменьшение дистрофических механизмов подразумевает применение гормональных и негормональных агентов, которые снижают дегенеративные и воспалительные изменения в мышечных волокнах [151].

В рамках нашего исследования оценивалось влияние гормональной терапии на двигательные функции детей с МДД на ранней амбулаторной стадии путем применения теста 6MWT, при котором увеличение пройденного расстояния за 12 месяцев наблюдения был выше у детей, принимающих ГКС (с $317,4 \pm 12,57$ до $348,1 \pm 9,65$ метров), напротив не принимающих детей (с $319,8 \pm 13,07$ до $324,4 \pm 8,23$ метров), однако, противоречивые данные приводятся у коллег из Италии и их результаты позволяют предположить, что возраст и лечение стероидами могут играть определенную роль в неоднородности прогрессирования заболевания [98, р.2327].

Для оценки моторных функций неамбулаторных детей, принимающих и не принимающих ГКС терапию применили временной тест на «подъем с положения лежа», который показал меньшую потерю у детей, получавшей ГКС (с $12 \pm 2,45$ сек. до $17 \pm 2,18$ сек.), чем в группе, не получавшей ГКС (с $13 \pm 3,54$ сек. до $24 \pm 3,68$ сек.).

Акцентируя внимание на молекулярно-генетических аспектах, необходимо подчеркнуть, что идентификация специфических типов мутаций приобретает фундаментальное значение не только в контексте прецизионной молекулярной диагностики, но и для прогностической стратификации пациентов и

имплементации персонализированных терапевтических подходов. В частности, молекулярная архитектура выявленных мутаций может детерминировать потенциальную эффективность инновационных методов молекулярно-направленной терапии, включая технологии экзон-скиппинга и генотерапевтические интервенции с применением рекомбинантных аденоассоциированных вирусных векторов [152]. Многообещающими исследованиями являются изучения в области генной терапии, как метод, восстанавливающий белок дистрофин. На сегодняшний день проведено 309 клинических испытаний (одобренные FDA) методов лечения на основе AAV, которые находятся на переднем крае генной терапии [153]. В Казахстане такого опыта на сегодняшний день нет.

Конечным ожидаемым эффектом многих терапевтических линий являются попытки восстановления белка дистрофина. В настоящее время используются ряд стратегий для восстановления экспрессии белка дистрофина, большинство из которых не предназначены для восстановления нативного белка дикого типа. Тем не менее, экспрессия измененного белка дистрофина может давать лучший фенотип, чем отсутствие экспрессии или усеченный, нестабильный белок [154]. Одним из одобренных лекарственных средств, предназначенный для экспрессии белка дистрофина при нонсенс-мутации является препарат Трансларна. Эта молекула изучалась на людях, совсем недавно [77,р.2458]. В рамках нашего исследования 13 детей с нонсенс-мутациями получали терапию препаратом Трансларна. Анализ моторных функций детей проводился на начало терапии и через 12 месяцев, который показал эффективность терапии в виде улучшения теста 6MWT ($p < 0,05$), и полученные нами данные соответствует с результатами John Hyun Namgoong [155].

Основные направления дальнейших исследований включают изучение новых генетических подходов к терапии, совершенствование реабилитационных программ и развитие национальной базы данных пациентов с МДД. Также важной задачей остаётся обеспечение доступности инновационных методов лечения и расширение программ раннего выявления заболевания, включая внедрение скрининга новорождённых [91,р.199].

Таким образом, данное исследование представляет собой значимый вклад в изучение миодистрофии Дюшенна в Казахстане, а полученные результаты подтверждают высокую прогностическую силу характеристик мутаций. Систематический анализ клинико-генетических характеристик миодистрофии Дюшенна в популяции Республики Казахстан предоставил возможность углубленному пониманию особенностей течения заболевания. Ключевые результаты проведенного исследования свидетельствуют о значительной клинико-генетической гетерогенности среди пациентов, включая вариабельность возраста манифестации симптомов, темпов прогрессирования заболевания и степени выраженности клинических проявлений, что демонстрирует высокую степень корреляции с данными, представленными в нашей работе.

Учитывая высокую летальность при естественном течении заболевания особую важность приобретает своевременная диагностика и терапия [61,р.934].

В рамках данного исследования, также и результаты многих исследований, показали эффективность гормональной и специфической патогенетической терапии, которые могут замедлять прогрессирование заболевания. Стратегии ведения и лечения мышечной дистрофии Дюшенна в Казахстане зависят от последних достижений и текущих проблем в системе здравоохранения. Доступ к лечению и уходу при мышечной дистрофии Дюшенна в Казахстане сопряжен со значительными трудностями, которые препятствуют улучшению результатов лечения и общего качества жизни пациентов. Фрагментированная система здравоохранения часто не замечает нейрогенетических заболеваний, при этом доступ к специализированной помощи, диагностическим инструментам и мультидисциплинарным командам, необходимым для эффективного лечения, ограничен.

Приоритизация проблемы МДД в системе здравоохранения Республики Казахстан может способствовать совершенствованию стандартов оказания медицинской помощи и углублению понимания патогенетических механизмов мышечной дистрофии в регионе. Агрегированные результаты исследования подчеркивают мультифакторную природу МДД и обосновывают необходимость проведения дальнейших научных изысканий, направленных на разработку персонализированных терапевтических стратегий с целью оптимизации качества жизни пациентов в Республике Казахстан.

Комплексное решение проблемы мышечной дистрофии Дюшенна (МДД) в Республике Казахстан представляет собой приоритетную задачу здравоохранения, направленную на оптимизацию качества жизни и улучшение показателей здоровья пациентов. Уникальные особенности генетического ландшафта и клинико-фенотипические характеристики популяции детерминируют необходимость имплементации персонализированного подхода к диагностике, мультидисциплинарному ведению и терапевтическим интервенциям.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе были изучены клинико-генетические характеристики миодистрофии Дюшенна, которое включало изучение частоты миодистрофии Дюшенна и наследования, описаны клинические особенности с учетом мутаций и получаемой терапии.

Таким образом, на основании полученных результатов проведенного нами исследования можно сделать следующие **выводы**:

1. Частота встречаемости миодистрофии Дюшенна в Казахстане составила 1 случай на 3311 мальчиков. Частота X-сцепленного наследования и спонтанных новых мутаций составили 64,4% и 35,6%, соответственно.

2. Делеционный спектр превалировал в 59,3% (95%ДИ: 51,9-68,9), при котором протяженные делеции – 81,5% (95%ДИ: 77,4-86,1). Мутации чаще выявлялись в активсвязывающем участке гена (60,4%; 95%ДИ: 51,5-70,1) и охватывали все типы. Нарушения трансляционной рамки считывания регистрировались в 82,4% (95%ДИ: 72,3-92,1) случаев, преимущественно в активсвязывающем (76,4%; 95%ДИ: 66,5-85,9) участке гена.

3. При нарушении рамки считывания показатели шкал NSAA и 6MWT были низкими и в динамике ухудшились, отмечался ранний дебют заболевания в $2,95 \pm 0,25$ лет и увеличение риска потери амбулаторности (ОР 12,36, 95%ДИ: 2,51-22,18), продолжительность самостоятельной ходьбы составила $3,9 \pm 0,26$ лет. Стандартная терапия повлияла на удлинение дистанции с $317,4 \pm 12,57$ метров до $348,1 \pm 9,65$ по 6MWT у амбулаторных детей, у неамбулаторных – на потерю в 5 секунд, против 11 секунд (у не принимающих стандартную терапию) по тесту «подъем из положения лежа». Таргетная терапия повлияла на улучшение показателя теста 6MWT с $327,4 \pm 2,57$ до $349,1 \pm 2,65$ метров за 12 месяцев.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Частота заболевания, выявленная в рамках данной работы, внесут пользу в создании и поддержании функционирования национального регистра пациентов с МДД, что обеспечит возможность проведения высокоточного эпидемиологического мониторинга и повысит доступность современных диагностических процедур.

В рамках данной работы точечные мутации, составившие треть случаев, диагностированы секвенированием гена, что подчеркивает о необходимости внедрения этого метода в нашей стране. Расчет трансляционной рамки считывания генетического кода может служить надежным маркером в прогнозировании течения заболевания.

Результаты нашей работы показали о значимости ранней инициации как гормональной, так и патогенетической терапии в улучшении исхода.

На основе знания типа и характеристики мутаций представляется возможным пренатальная диагностика и точная медико-генетическая консультация для профилактики новых случаев в отягощенных семьях.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Matsuo M., Awano H., Matsumoto M., Nagai M., Kawaguchi T., Zhang Z., Nishio H. Dystrophin Dp116: A yet to Be Investigated Product of the Duchenne Muscular Dystrophy Gene // *Genes*. – Basel, 2017. – Vol. 8, №10. – P. 251.
- 2 Mahmood O.A., Jiang X.M. Limb-girdle muscular dystrophies: where next after six decades from the first proposal (Review) // *Mol Med Rep*. – 2014. - Vol. 9, №5. – P. 1515-32.
- 3 Zernov N., Skoblov M. Genotype-phenotype correlations in FSHD // *BMC Med Genomics*. – 2019. - Vol. 12, №2. – P. 43.
- 4 Theadom A., Rodrigues M., Roxburgh R., Balalla S., Higgins C., Bhattacharjee R., Jones K., Krishnamurthi R., Feigin V. Prevalence of muscular dystrophies: a systematic literature review // *Neuroepidemiology*. – 2014. - Vol. 43, №3-4. – P. 259-68.
- 5 Mah J.K., Korngut L., Dykeman J., Day L., Pringsheim T., Jette N. A systematic review and meta-analysis on the epidemiology of Duchenne and Becker muscular dystrophy // *NeuromusculDisord*. – 2014. - Vol. 24, №6. – P. 482-491.
- 6 Mah J.K., Korngut L., Fiest K.M., Dykeman J., Day L.J., Pringsheim T., Jette N. A Systematic Review and Meta-analysis on the Epidemiology of the Muscular Dystrophies // *Can J Neurol Sci*. – 2016. - Vol. 43, №1. – P. 163-177.
- 7 Adams J.C., Brancaccio A. The evolution of the dystroglycan complex, a major mediator of muscle integrity // *Biol Open*. – 2015. - Vol. 4, №9. – P. 1163-1179.
- 8 Chamova T., Guergueltcheva V., Raycheva M., Todorov T., Genova J., Bichev S., Bojinova V., Mitev V., Tournev I., Todorova A. Association between loss of dp140 and cognitive impairment in duchenne and becker dystrophies // *Balkan J Med Genet*. – 2013. - Vol. 16, №1. – P. 21-30.
- 9 Aartsma-Rus A., Ginjaar I.B., Bushby K. The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy // *J Med Genet*. – 2016. - Vol. 53, №3. – P. 145-151.
- 10 Chengmei S., LuoanShen, ZhengZhang, XinXie. Therapeutic Strategies for Duchenne Muscular Dystrophy: An Update // *Genes*. – Basel, 2020. - Vol. 11. – P. 837.
- 11 Verhaart I.E., Aartsma-Rus A. Therapeutic developments for Duchenne muscular dystrophy // *Nat Rev Neurol*. – 2019. - Vol. 15, №7. – P. 373-386.
- 12 Grages S.M., Bell M., Berlau D.J. New and emerging pharmacotherapy for duchenne muscular dystrophy: a focus on synthetic therapeutics // *Expert OpinPharmacother*. – 2020. - Vol. 21, №7. – P. 841-851.
- 13 Frank D.E., Schnell F.J., Akana C., El-Husayni S.H., Desjardins C.A., Morgan J., Charleston J.S., Sardone V., Domingos J., Dickson G., Straub V., Guglieri M., Mercuri E., Servais L., Muntoni F. SKIP-NMD Study Group. Increased dystrophin production with golodirsén in patients with Duchenne muscular dystrophy // *Neurology*. – 2020. - Vol. 94, №21. – P. 2270-2282.
- 14 Aartsma-Rus A., Corey D.R. The 10th Oligonucleotide Therapy Approved: Golodirsén for Duchenne Muscular Dystrophy // *Nucleic Acid Ther*. – 2020. - Vol.

30, №2. – P. 67-70.

15 Roshmi R.R., Yokota T. Viltolarsen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy // *Drugs Today*. – Barc, 2019. - Vol. 55, №10. – P. 627-639.

16 Iskandar K., Dwianingsih E.K., Pratiwi L., Kalim A.S., Mardhiah H., Putranti A.H., Nurputra D.K., Triono A., Herini E.S., Malueka R.G., GunadiLai, Sunartini P.S. The analysis of DMD gene deletions by multiplex PCR in Indonesian DMD/BMD patients: the era of personalized medicine // *BMC Res Notes*. – 2019. - Vol. 12, №1. – P. 704.

17 Benemei S., Gatto F., Boni L., Pane M. If you cannot measure it, you cannot improve it. Outcome measures in Duchenne Muscular Dystrophy: current and future perspectives // *Acta Neurol Belg*. – 2025. - Vol. 125, №1. – P. 1-12.

18 Джаксыбаева А.Х. Менеджмент нервно-мышечных заболеваний у детей в Казахстане: вопросы и пути решения // *Педиатрия и детская хирургия*. – 2020. - №2100. – P. 13-22.

19 Muraine L., Bensalah M., Dhiab J., Cordova G., Arandel L., Marhic A., Chapart M., Vasseur S., Benkhelifa-Ziyyat S., Bigot A., Butler-Browne G., Mouly V., Negroni E., Trollet C. Transduction Efficiency of Adeno-Associated Virus Serotypes After Local Injection in Mouse and Human Skeletal Muscle // *Hum Gene Ther*. – 2020. - Vol. 31, №3-4. – P. 233-240.

20 Siemionow M., Langa P., Brodowska S., Kozłowska K., Zalants K., Budzynska K., Heydemann A. Long- term Protective effect of Human Dystrofin expressing chimeric (DEC) cell therapy of Amelioration of function Of cardiac, respiratory and skeletal mucsles in Duchenne Muscular Dystrophy // *Stem Cell Rev Rep*. – 2022. - Vol. 18, №8. – P. 2872-2892.

21 Ryder S., Leadley R.M., Armstrong N., Westwood M., de Kock S., Butt T., Jain M., Kleijnen J. The burden, epidemiology, costs and treatment for Duchenne muscular dystrophy: an evidence review // *Orphanet J Rare Dis*. – 2017. - Vol. 12, №1. – P. 79.

22 Saito T., Kawai M., Kimura E., Ogata K., Takahashi T., Kobayashi M., Takada H., Kuru S., Mikata T., Matsumura T., Yonemoto N., Fujimura H., Sakoda S. Study of Duchenne muscular dystrophy long-term survivors aged 40 years and older living in specialized institutions in Japan // *NeuromusculDisord*. – 2017. - Vol. 27, №2. – P. 107-114.

23 Miles D., Bachelot T. et al. Final results from the PERUSE study of first-line pertuzumab plus trastuzumab plus a taxane for HER2-positive locally recurrent or metastatic breast cancer, with a multivariable approach to guide prognostication // *Annals of Oncology*. – 2000. – Vol. 32, №10. – P. 1245 – 1255.

24 Wu J., Wang C., Toh S., Pisa F.E., Bauer L. Use of real-world evidence in regulatory decisions for rare diseases in the United States-Current status and future directions // *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. – 2020. - Vol. 29, №10. – P. 1213-1218.

25 Duan D., Goemans N., Takeda S., Mercuri E., Aartsma-Rus A. Duchenne muscular dystrophy // *Nat Rev Dis Primers*. - 2021. - Vol. 7, №1. – P. 13.

26 Florczyk-Soluch U., Polak K., Dulak J. The multifaceted view of heart problem in Duchenne muscular dystrophy // *Cellular and Molecular Life Sciences*. - 2021. - Vol. 78. – P. 5447–5468.

27 Tsang M., Chiu A., Kwong B., Liang R., Yu M. Diagnostic value of whole-exome sequencing in Chinese pediatric-onset neuromuscular patients // *Mol Genet Genomic Med.* – 2020. - Vol. 8. – P. 1205.

28 Powell P.A., Carlton J., Rowen D., Chandler F., Guglieri M., Brazier J.E. Development of a New Quality of Life Measure for Duchenne Muscular Dystrophy Using Mixed Methods: The DMD-QoL // *Neurology.* – 2021. - Vol. 96, №19. – P. 2438-2450.

29 Kong X., Zhong X., Liu L., Cui S., Yang Y., Kong L. Genetic analysis of 1051 Chinese families with Duchenne. Becker Muscular Dystrophy // *BMC Med Genet.* – 2019. - Vol. 20, №1. – P. 139.

30 Luo S., He W., Zhao X., Yang X., Gao B., Li S., Du J., Zhang Q., Tan Y., Lu G., Lin G., Li W. Genetic testing and prenatal diagnosis of 671 Chinese pedigrees affected with Duchenne/Becker muscular dystrophy // *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* – 2022. - Vol. 39, №9. – P. 925-931.

31 Basta M., Pandya A.M. Genetics, X-Linked Inheritance 2023. In: *StatPearls.* - Treasure Island: StatPearls Publishing, 2025. – 150 p.

32 Ganassi M., Zammit P.S. Involvement of muscle satellite cell dysfunction in neuromuscular disorders: Expanding the portfolio of satellite cellopathies // *Eur J Transl Myol.* – 2022. - Vol. 32, №1. – P. 10064.

33 Liu S., Su T., Xia X., Zhou Z.H. Native DGC structure rationalizes muscular dystrophy-causing mutations // *Nature.* – 2025. - Vol. 637, №8048. – P. 1261-1271.

34 Doorenweerd N. Combining genetics, neuropsychology and neuroimaging to improve understanding of brain involvement in Duchenne muscular dystrophy - a narrative review // *Neuromuscul Disord.* – 2020. - Vol. 30, №6. – P. 437-442.

35 Poyatos-García J., Martí P., Liquori A., Muelas N., Pitarch I., Martínez-Dolz L., Rodríguez B., Gonzalez-Quereda L., Damiá M., Aller E., Selva-Gimenez M., Vilchez R., Diaz-Manera J., Alonso-Pérez J., Barcena J.E., Jauregui A., Gámez J., Aladrén J.A., Fernández A., Montolio M., Azorin I., Hervas D., Casasús A., Nieto M., Gallano P., Sevilla T., Vilchez J.J. Dystrophinopathy Phenotypes and Modifying Factors in DMD Exon 45-55 Deletion // *Ann Neurol.* – 2022. - Vol. 92, №5. – P. 793-806.

36 Jaxybayeva A., Chunkayeva D., Myrzaliyeva B., Ayaganov D., Lepessova M., Bulekbayeva S., Idrissova Z., Mukhambetova G., Bayanova M., Malfatti E., Urtizberea A. Duchenne Muscular Dystrophy in Kazakhstan: A Journey from Diagnosis to the Treatment, the Biases and Achievements // *J Neuromuscul Dis.* – 2023. - Vol. 10, №2. – P. 263-269.

37 Hoang T., Dowdy R.A. A Review of Muscular Dystrophies // *Anesth Prog.* - 2024. - Vol. 71, №1. – P. 44-52.

38 Chang M., Cai Y., Gao Z. et al. Duchenne muscular dystrophy: pathogenesis and promising therapies // *J Neurol.* - 2023. - Vol. 270. – P. 3733–3749.

39 Fortunato F., Farn M., Ferlini A. The DMD gene and therapeutic approaches to restore dystrophin // *Neuromuscul Disord.* – 2021. - Vol. 31, №10. – P. 1013-1020.

40 Palmieri L., Ferrand M., Vu Hong A., Richard I., Albin S. In Silico Structural Prediction for the Generation of Novel Performant Midi-Dystrophins

Based on Intein-Mediated Dual AAV Approach // *Int J Mol Sci.* – 2024. - Vol. 25, №19. – P. 10444.

41 Egli M., Manoharan M. Chemistry, structure and function of approved oligonucleotide therapeutics // *Nucleic Acids Res.* – 2023. - Vol. 51, №6. – P. 2529-2573.

42 Farini A., Tripodi L., Villa C., Strati F., Facchetti A., Baselli G., Troisi J., Landolfi A., Lonati C., Molinaro D., Wintzinger M., Gatti S., Cassani B., Caprioli F., Facciotti F., Quattrocchi M., Torrente Y. Microbiota dysbiosis influences immune system and muscle pathophysiology of dystrophin-deficient mice // *EMBO Mol Med.* – 2023. - Vol. 15, №3. – P. 16244.

43 Yedigaryan L., Sampaolesi M. Therapeutic Implications of miRNAs for Muscle-Wasting Conditions // *Cells.* – 2021. - Vol. 10, №11. – P. 3035.

44 Sahani R., Wallace C.H., Jones B.K., Blemker S.S. Diaphragm muscle fibrosis involves changes in collagen organization with mechanical implications in Duchenne muscular dystrophy // *J Appl Physiol.* - 1985. - Vol. 132, №3. – P. 653-672.

45 Russell A.J., DuVall M., Barthel B., Qian Y., Peter A.K., Newell-Stamper B.L., Hunt K., Lehman S., Madden M., Schlachter S., Robertson B., Van Deusen A., Rodriguez H.M., Vera C., Su Y., Claflin D.R., Brooks S.V., Nghiem P., Rutledge A., Juehne T.I., Yu J., Barton E.R., Luo Y.E., Patsalos A., Nagy L., Sweeney H.L., Leinwand L.A., Koch K. Modulating fast skeletal muscle contraction protects skeletal muscle in animal models of Duchenne muscular dystrophy // *J Clin Invest.* – 2023. - Vol. 133, №10. – P. 153837.

46 Starosta A., Konieczny P. Therapeutic aspects of cell signaling and communication in Duchenne muscular dystrophy // *Cell Mol Life Sci.* – 2021. - Vol. 78, №11. – P. 4867-4891.

47 Stirm M., Klymiuk N., Nagashima H., Kupatt C., Wolf E. Pig models for translational Duchenne muscular dystrophy research // *Trends Mol Med.* – 2024. - Vol. 30, №10. – P. 950-964.

48 Fortunato F., Farnè M., Ferlini A. The DMD gene and therapeutic approaches to restore dystrophin // *NeuromusculDisord.* – 2021. - Vol. 31, №10. – P. 1013-1020.

49 D'Ambrosio E.S., Mendell J.R. Evolving Therapeutic Options for the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy // *Neurotherapeutics.* – 2023. - Vol. 20, №6. – P. 1669-1681.

50 Delaney R., O'Halloran K.D. Respiratory performance in Duchenne muscular dystrophy: Clinical manifestations and lessons from animal models // *Exp Physiol.* – 2024. - Vol. 109, №9. – P. 1426-1445.

51 Otake M., Imamura M., Enya S., Kangawa A., Shibata M., Ozaki K., Kimura K., Ono E., Aoki Y. Severe cardiac and skeletal manifestations in DMD-edited microminipigs: an advanced surrogate for Duchenne muscular dystrophy // *Commun Biol.* – 2024. - Vol. 7, №1. – P. 523.

52 Tang A., Yokota T. Duchenne muscular dystrophy: promising early-stage clinical trials to watch // *Expert OpinInvestig Drugs.* – 2024. - Vol. 33, №3. – P. 201-217.

53 Houwen-van Opstal S.L.S., Van der Holst M., Willemsen M.A., Niks E.H., De Groot I.J., Cup E.H. Longitudinal Course of Long Finger Flexor Shortening in Males with Duchenne Muscular Dystrophy: A Retrospective Review // J Neuromuscul Dis. – 2024. - Vol. 11, №1. – P. 17-23.

54 Garegnani L., Hyland M., Roson Rodriguez P., Escobar Liquitay C.M.E., Franco J.V. Antioxidants to prevent respiratory decline in people with Duchenne muscular dystrophy and progressive respiratory decline // Cochrane Database Syst Rev. – 2021. - Vol. 11, №11. – P. 13720.

55 Houwen-van Opstal S.L., Timmer A.C., Ten Ham A.M., Hosman A.J., Willemsen M.A., de Groot I.J. Orthopedic Interventions for Foot Deformities in Non-Ambulant People with Duchenne Muscular Dystrophy: A Retrospective Study on Indications, Post-Operative and Long-Term Outcomes // JNeuromuscul Dis. – 2022. - Vol. 9, №5. – P. 641-648.

56 Hurley-Novatny A., Chang D., Murakami K., Wang L., Li H. Poor bone health in Duchenne muscular dystrophy: a multifactorial problem beyond corticosteroids and loss of ambulation // Front Endocrinol. – Lausanne, 2024. - Vol. 15. – P. 1398050.

57 McCarrison S., Abdelrahman S., Quinlivan R., Keen R., Wong S.C. Pharmacological and non-pharmacological therapies for prevention and treatment of osteoporosis in Duchenne Muscular Dystrophy: A systematic review // Bone. – 2025. - Vol. 193. – P. 117410.

58 Bourgeois Yoshioka C.K., Takenaka-Ninagawa N., Goto M., Miki M., Watanabe D., Yamamoto M., Aoyama T., Sakurai H. Cell transplantation-mediated dystrophin supplementation efficacy in Duchenne muscular dystrophy mouse motor function improvement demonstrated by enhanced skeletal muscle fatigue tolerance // Stem Cell Res Ther. – 2024. - Vol. 15, №1. – P. 313.

59 Saad F.A., Siciliano G., Angelini C. Advances in Dystrophinopathy Diagnosis and Therapy // Biomolecules. – 2023. - Vol. 13, №9. – P. 1319.

60 Venugopal V., Pavlakis S. Duchenne Muscular Dystrophy 2023. In: StatPearls. - Treasure Island: StatPearls Publishing, 2025. –294p.

61 Happi Mbakam C., Lamothe G., Tremblay G., Tremblay J.P. CRISPR-Cas9 Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy // Neurotherapeutics. – 2022. - Vol. 19, №3. – P. 931-941.

62 Markati T., Oskoui M., Farrar M.A., Duong T., Goemans N., Servais L. Emerging therapies for Duchenne muscular dystrophy // Lancet Neurol. – 2022. - Vol. 21, №9. – P. 814-829.

63 Pascual-Morena C., Cavero-Redondo I., Sequí-Domínguez I., Rodríguez-Gutiérrez E., Visier-Alfonso M.E., Martínez-Vizcaíno V. Intelligence quotient-genotype association in dystrophinopathies: A systematic review and meta-analysis // Neuropathol Appl Neurobiol. – 2023. - Vol. 49, №3. – P. 12914.

64 Cheng B., Xu H., Zhou H., Guo Y., Roberts N., Li N., Hu X., Chen X., Xu K., Lan Y., Ma X., Cai X., Guo Y. Connectomic disturbances in Duchenne muscular dystrophy with mild cognitive impairment // Cereb Cortex. – 2023. - Vol. 33, №11. – P. 6785-6791.

65 Gregg J., Wilson C., Curran D., Hanna D. Neurocognitive functioning among children and young people with Duchenne Muscular Dystrophy: A systematic review and meta-analysis // *Clin Neuropsychol.* – 2024. - Vol. 38, №8. – P. 1806-1833.

66 Kenepf A., Russell-Giller S., Seehra S., Fee R., Hinton V.J. Reading skills over time among children with Duchenne muscular dystrophy // *Child Neuropsychol.* – 2025. - Vol. 31, №3. – P. 467-486.

67 Patterson G., Conner H., Groneman M., Blavo C., Parmar M.S. Duchenne muscular dystrophy: Current treatment and emerging exon skipping and gene therapy approach // *Eur J Pharmacol.* – 2023. - Vol. 947. – P. 175675.

68 Bello L., Hoffman E.P., Pegoraro E. Is it time for genetic modifiers to predict prognosis in Duchenne muscular dystrophy? // *Nat Rev Neurol.* – 2023. - Vol. 19, №7. – P. 410-423.

69 Tavakoli N.P., Gruber D., Armstrong N., Chung W.K., Maloney B., Park S., Wynn J., Koval-Burt C., Verdade L., Tegay D.H., Cohen L.L., Shapiro N., Kennedy A., Noritz G., Ciafaloni E., Weinberger B., Ellington M.J., Schleien C., Spinazzola R., Sood S., Brower A., Lloyd-Puryear M., Caggana M. Duchenne Muscular Dystrophy Pilot Study Group. Newborn screening for Duchenne muscular dystrophy: A two-year pilot study // *Ann Clin Transl Neurol.* – 2023. - Vol. 10, №8. – P. 1383-1396.

70 Mai J., Duan J., Chen X., Liu L., Liang D., Fu T., Lu G., Chan W.Y., Luo X., Wen F., Liao J., Li Z., Lu X. Optical genome mapping: Unraveling complex variations and enabling precise diagnosis in dystrophinopathy // *Ann Clin Transl Neurol.* – 2025. - Vol. 12, №1. – P. 43-55.

71 Erbe L.S., Hoffjan S., Janßen S., Kneifel M., Krause K., Gerding W.M., Döring K., Güttsches A.K., Roos A., Buena Atienza E., Gross C., Lücke T., Nguyen H.H.P., Vorgerd M., Köhler C. Exome Sequencing and Optical Genome Mapping in Molecularly Unsolved Cases of Duchenne Muscular Dystrophy: Identification of a Causative X-Chromosomal Inversion Disrupting the DMD Gene // *Int J Mol Sci.* – 2023. - Vol. 24, №19. – P. 14716.

72 Gao Z., Liu L., Wang Y., Wang Y., Huang W., Kong X. Analysis of results of prenatal diagnosis for 67 pedigrees affected with Duchenne muscular dystrophy in the central plain region of China // *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* – 2022. - Vol. 39, №7. – P. 669-673.

73 Santin R., Vieira I.A., Nunes J.C., Benevides M.L., Quadros F., Brusius-Facchin A.C., Macedo G., Bertoni A.P. A novel DMD intronic alteration: a potentially disease-causing variant of an intermediate muscular dystrophy phenotype // *Acta Myol.* – 2021. - Vol. 40, №2. – P. 93-100.

74 Zhu Y., Yang L., Ma T., Lu Y., Tao D., Liu Y., Ma Y. Identification of two rare mutations c.1318G>A and c.6438+2T>G in a Chinese DMD family as genetic markers // *Genes Genomics.* – 2020. - Vol. 42, №9. – P. 1067-1074.

75 Hua C., Liu L., Kong X. Prenatal diagnosis of 1408 fetuses at risk of DMD/BMD by MLPA and Sanger sequencing combined with STR linkage analysis // *BMC Med Genomics.* – 2023. - Vol. 16, №1. – P. 310.

76 Shen J., Ding T., Sun X., Yang J., Zhang Y., Wang J., Ge M., Xu H., Xie J., Wang F., Diao F. Comprehensive analysis of genomic complexity in the 5' end

coding region of the DMD gene in patients of exons 1-2 duplications based on long-read sequencing // BMC Genomics. – 2024. - Vol. 25, №1. – P. 292.

77 Amar-Schwartz A., Cohen Y., Elhaj A., Ben-Hur V., Siegfried Z., Karni R., Dor T. Inhibition of nonsense-mediated mRNA decay may improve stop codon read-through therapy for Duchenne muscular dystrophy // Hum Mol Genet. – 2023. - Vol. 32, №15. – P. 2455-2463.

78 Berling E., Nicolle R., Laforêt P., Ronzitti G. Gene therapy review: Duchenne muscular dystrophy case study // Rev Neurol. – Paris, 2023. - Vol. 179, №1-2. – P. 90-105.

79 Lee B.H. The Dystrophinopathies // Continuum (Minneap Minn). - 2022. - Vol. 28, №6. – P. 1678-1697.

80 Foncuberta M.E., Monges S., Medina A., Lubieniecki F., Gravina L.P. A novel deep intronic variant in the DMD gene causes Duchenne muscular dystrophy by pseudoexon activation encoding a nonsense codon // Gene. – 2024. - Vol. 930. – P. 148862.

81 Henzi B.C., Lava S.A.G., Spagnuolo C., Putananickal N., Donner B.C., Pfluger M., Burkhardt B., Fischer D. Tamoxifen may contribute to preserve cardiac function in Duchenne muscular dystrophy // Eur J Pediatr. – 2024. - Vol. 183, №9. – P. 4057-4062.

82 McDonald C.M., Marbán E., Hendrix S., Hogan N., Ruckdeschel Smith R., Eagle M., Finkel R.S., Tian C., Janas J., Harmelink M.M., Varadhachary A.S., Taylor M.D., Hor K.N., Mayer O.H., Henricson E.K., Furlong P., Ascheim D.D., Rogy S., Williams P., Marbán L. HOPE-2 Study Group. Repeated intravenous cardiosphere-derived cell therapy in late-stage Duchenne muscular dystrophy (HOPE-2): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial // Lancet. – 2022. - Vol. 399, №10329. – P. 1049-1058.

83 Elangkován N., Dickson G. Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy // J Neuromuscul Dis. – 2021. - Vol. 8, №2. – P. 303-316.

84 Nallamilli B.R., Chaubey A., Valencia C.A., Stansberry L., Behlmann A.M., Ma Z., Mathur A., Shenoy S., Ganapathy V., Jagannathan L., Ramachander V., Ferlini A., Bean L., Hegde M. A single NGS-based assay covering the entire genomic sequence of the DMD gene facilitates diagnostic and newborn screening confirmatory testing // Hum Mutat. – 2021. - Vol. 42, №5. – P. 626-638.

85 Cho M.S., Lee J.M. A novel single-base mutation mimicking exon deletion of MLPA in symptomatic Duchenne muscular dystrophy carrier // Acta Neurol Belg. – 2021. - Vol. 121, №1. – P. 287-289.

86 Xie Y., Luo J., Zhong J., Lan D. Clinical Diagnosis and Genetic Analysis of Children With Muscular Dystrophies // ClinPediatr. – Phila, 2024. - Vol. 28. – P. 992.

87 Summa S., Ittiwut C., Kulsirichawaroj P., Paprad T., Likasitwattanakul S., Sanmaneechai O., Boonsimma P., Suphapeetiporn K., Shotelersuk V. Utilisation of exome sequencing for muscular disorders in Thai paediatric patients: diagnostic yield and mutational spectrum // Sci Rep. – 2023. - Vol. 13, №1. – P. 1376.

88 Dama T., Chheda P., Limaye S., Pande S., Vinarkar S. Evaluation of Single Exon Deletions in DMD/BMD: Technical and Analytical Concerns // *Neurol India*. – 2022. - Vol. 70, №4. – P. 1615-1617.

89 Nallamilli B.R., Guraju N., Jump V., Liu R., Hegde M. Molecular Diagnosis of Duchenne Muscular Dystrophy Using Single NGS-Based Assay // *Curr Protoc*. – 2023. - Vol. 3, №2. – P. 669.

90 Tang F., Xiao Y., Zhou C., Zhang H., Wang J., Zeng Y. NGS-based targeted sequencing identified six novel variants in patients with Duchenne/Becker muscular dystrophy from southwestern China // *BMC Med Genomics*. – 2023. - Vol. 16, №1. – P. 121.

91 Gruber D., Lloyd-Puryear M., Armstrong N., Scavina M., Tavakoli N.P., Brower A.M., Caggana M., Chung W.K. Newborn screening for Duchenne muscular dystrophy-early detection and diagnostic algorithm for female carriers of Duchenne muscular dystrophy // *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. – 2022. - Vol. 190, №2. – P. 197-205.

92 Carraro L., Iosca A., Dainesi M.I., Fusco S., Chieffo D.P., Moriconi F., d'Amario G., Pane M., Mercuri E., Berardinelli A. Cognitive function in DMD carriers: personal case series and literature review // *Acta Myol*. – 2023. - Vol. 42, №2-3. – P. 53-59.

93 Politano L. Females with X-Linked Muscle Disorders: an underestimated patient population // *Acta Myol*. – 2025. - Vol. 44, №1. – P. 33-36.

94 Araujo A.P., Saute J.A., Fortes C.P., França M.C., Pereira J.A., Albuquerque M.A., Carvalho A.A., Cavalcanti E.B., Covalski A.P., Fagundes S.C., Gurgel-Giannetti J., Gonçalves M.V., Martinez A.R., Coimbra Neto A.R., Neves F.R., Nucci A., Nucera A.P., Pessoa A.L., Rebel M.F., Santos F.N., Scola R.H., Sobreira C.F. Update of the Brazilian consensus recommendations on Duchenne muscular dystrophy // *ArqNeuropsiquiatr*. – 2023. - Vol. 81, №1. – P. 81-94.

95 Unnikrishnan G., Polavarapu K., Bardhan M., Nashi S., Vengalil S., Preethish-Kumar V., Valasani R.K., Huddar A., Nishadham V., Nandeesh B.N., Nalini A. Phenotype Genotype Characterization of FKRP-related Muscular Dystrophy among Indian Patients // *J Neuromuscul Dis*. – 2023. - Vol. 10, №4. – P. 615-626.

96 McDonald C., Camino E., Escandon R., Finkel R.S., Fischer R., Flanigan K., Furlong P., Juhasz R., Martin A.S., Villa C., Sweeney H.L. Draft Guidance for Industry Duchenne Muscular Dystrophy, Becker Muscular Dystrophy, and Related Dystrophinopathies - Developing Potential Treatments for the Entire Spectrum of Disease // *J Neuromuscul Dis*. – 2024. - Vol. 11, №2. – P. 499-523.

97 Powell P.A., Carlton J. A comprehensive qualitative framework for health-related quality of life in Duchenne muscular dystrophy // *Qual Life Res*. – 2023. - Vol. 32, №1. – P. 225-236.

98 Geuens S., Van Dessel J., Govaarts R., Ikelaar N.A., Meijer O.C., Kan H.E., Niks E.H., Goemans N., Lemiere J., Doorenweerd N., De Waele L. Comparison of two corticosteroid regimens on brain volumetrics in patients with Duchenne muscular dystrophy // *Ann Clin Transl Neurol*. – 2023. - Vol. 10, №12. – P. 2324-2333.

99 Soblechero-Martín P., López-Martínez A., de la Puente-Ovejero L., Vallejo-

Illarramendi A., Arechavala-Gomez V. Utrophin modulator drugs as potential therapies for Duchenne and Becker muscular dystrophies // *Neuropathol Appl Neurobiol.* – 2021. - Vol. 47, №6. – P. 711-723.

100 Wu R., Li P., Xiao P., Zhang S., Wang X., Liu J., Sun W., Chang Y., Ai X., Chen L., Zhuo Y., Wang J., Wang Z., Li S., Li Y., Ji W., Guo W., Wu S., Chen Y. Activation of endogenous full-length utrophin by MyoAAV-UA as a therapeutic approach for Duchenne muscular dystrophy // *Nat Commun.* – 2025. - Vol. 16, №1. - P. 2398.

101 Ghosh G., Samui S., Das S., Singh V., Pal D., Das S., Naskar J., Sinha Roy S., Basu U. Poly C Binding Protein 2 dependent nuclear retention of the utrophin-A mRNA in C2C12 cells // *RNA Biol.* – 2021. - Vol. 18, №2. – P. 612-622.

102 Biggar W.D., Skalsky A., McDonald C.M. Comparing Deflazacort and Prednisone in Duchenne Muscular Dystrophy // *J Neuromuscul Dis.* – 2022. - Vol. 9, №4. – P. 463-476.

103 Liu G., Lipari P., Mollin A., Jung S., Teplova I., Li W., Ying L., More V., Lennox W., Yeh S., McGann E., Moon Y.C., Rice C., Huarte E., Gruszka B., Ray B., Goodwin E., Buckendahl P., Yurkow E., Braughton B., Narasimhan J., Welch E., Voronin G., Weetall M. Comparison of pharmaceutical properties and biological activities of prednisolone, deflazacort, and vamorolone in DMD disease models // *Hum Mol Genet.* – 2024. - Vol. 33, №3. – P. 211-223.

104 McDonald C.M., Marden J.R., Shieh P.B., Wong B.L., Lane H., Zhang A., Nguyen H., Frean M., Trifillis P., Koladicz K., Signorovitch J. Disease progression rates in ambulatory Duchenne muscular dystrophy by steroid type, patient age and functional status // *J Comp Eff Res.* – 2023. - Vol. 12, №4. – P. 220190.

105 Krishna L., Prashant A., Kumar Y.H., Paneyala S., Patil S.J., Ramachandra S.C., Vishwanath P. Molecular and Biochemical Therapeutic Strategies for Duchenne Muscular Dystrophy // *Neurol Int.* – 2024. - Vol. 16, №4. – P. 731-760.

106 Yao S., Chen Z., Yu Y., Zhang N., Jiang H., Zhang G., Zhang Z., Zhang B. Current Pharmacological Strategies for Duchenne Muscular Dystrophy // *Front Cell Dev Biol.* – 2021. - Vol. 9. – P. 689533.

107 McDonald C.M., Muntoni F., Penematsa V., Jiang J., Kristensen A., Bibbiani F., Goodwin E., Gordish-Dressman H., Morgenroth L., Werner C., Li J., Able R., Trifillis P., Tulinius M. Study 019 investigators. Ataluren delays loss of ambulation and respiratory decline in nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy patients // *J Comp Eff Res.* – 2022. - Vol. 11, №3. – P. 139-155.

108 Mercuri E., Osorio A.N., Muntoni F., Buccella F., Desguerre I., Kirschner J., Tulinius M., de Resende M.B.D., Morgenroth L.P., Gordish-Dressman H., Johnson S., Kristensen A., Werner C., Trifillis P., Henricson E.K., McDonald C.M. STRIDE and CINRG DNHS investigators. Safety and effectiveness of ataluren in patients with nonsense mutation DMD in the STRIDE Registry compared with the CINRG Duchenne Natural History Study (2015-2022): 2022 interim analysis // *J Neurol.* – 2023. - Vol. 270, №8. – P. 3896-3913.

109 Golli T., Juříková L., Sejersen T., Dixon C. The role of ataluren in the treatment of ambulatory and non-ambulatory children with nonsense mutation duchenne muscular dystrophy - a consensus derived using a modified Delphi

methodology in Eastern Europe // BMC Neurol. – Greece; Israel; Sweden, 2024. - Vol. 24, №1. – P. 73.

110 Ahmad M., ElRasoul A., Sedayou R., Tamboosi M., Mahroos H., Alrashed S., Tunkar M., Alzahrani F., Alharbi M., Aljehani M., Alahmari M., Alqarni K., Gashlan M., Yilmaz B.S., Alshaikh N.M. Safety and effectiveness of ataluren in patients with Duchenne muscular dystrophy: single-center experience from Saudi Arabia // J Int Med Res. – 2024. - Vol. 52, №12. – P. 300.

111 Wang D., Xue X., Gunn G., Du M., Siddiqui A., Weetall M., Keeling K.M. Ataluren suppresses a premature termination codon in an MPS I-H mouse // J Mol Med (Berl). – 2022. - Vol. 100, №8. – P. 1223-1235.

112 Huang S., Bhattacharya A., Ghelfi M.D., Li H., Fritsch C., Chenoweth D.M., Goldman Y.E., Cooperman B.S. Ataluren binds to multiple protein synthesis apparatus sites and competitively inhibits release factor-dependent termination // Nat Commun. – 2022. - Vol. 13, №1. – P. 2413.

113 Dori A., Scutifero M., Passamano L., Zoppi D., Ruggiero L., Trabacca A., Politano L. Treatment with ataluren in four symptomatic Duchenne carriers. A pilot study // Acta Myol. – 2024. - Vol. 43, №1. – P. 8-15.

114 Michael E., Sofou K., Wahlgren L., Kroksmark A.K., Tulinius M. Long term treatment with ataluren-the Swedish experience // BMC MusculoskeletDisord. – 2021. - Vol. 22, №1. – P. 837.

115 Leckie J., Zia A., Yokota T. An Updated Analysis of Exon-Skipping Applicability for Duchenne Muscular Dystrophy Using the UMD-DMD Database // Genes. – Basel, 2024. - Vol. 15, №11. – P. 1489.

116 Mendell J.R., Khan N., Sha N., Eliopoulos H., McDonald C.M., Goemans N., Mercuri E., Lowes L.P., Alfano L.N.Eteplirsen Study Group. Comparison of Long-term Ambulatory Function in Patients with Duchenne Muscular Dystrophy Treated with Eteplirsen and Matched Natural History Controls // J Neuromuscul Dis. – 2021. - Vol. 8, №4. – P. 469-479.

117 Iff J., Zhong Y., Tuttle E., Gupta D., Paul X., Erik Henricson. Real-world evidence of eteplirsen treatment effects in patients with Duchenne muscular dystrophy in the USA // J Comp Eff Res. – 2023. - Vol. 12, №9. – P. 230086.

118 Mitelman O., Abdel-Hamid H.Z., Byrne B.J., Connolly A.M., Heydemann P., Proud C., Shieh P.B., Wagner K.R., Dugar A., Santra S., Signorovitch J., Goemans N. Investigators from the LNMRC Natural History study; McDonald CM; investigators from the CINRG Duchenne National History Study; Mercuri E; investigators from The DMD Italian Group; Mendell JR. A Combined Prospective and Retrospective Comparison of Long-Term Functional Outcomes Suggests Delayed Loss of Ambulation and Pulmonary Decline with Long-Term Eteplirsen Treatment // J Neuromuscul Dis. – 2022. - Vol. 9, №1. – P. 39-52.

119 Wagner K.R., Kuntz N.L., Koenig E., East L., Upadhyay S., Han B., Shieh P.B. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of casimersen in patients with Duchenne muscular dystrophy amenable to exon 45 skipping: A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-titration trial // Muscle Nerve. – 2021. - Vol. 64, №3. - P. 285-292.

120 Migliorati J.M., Liu S., Liu A., Gogate A., Nair S., Bahal R., Rasmussen

T.P., Manautou J.E., Zhong X.B. Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion of US Food and Drug Administration-Approved Antisense Oligonucleotide Drugs // *Drug Metab Dispos.* – 2022. - Vol. 50, №6. – P. 888-897.

121 Servais L., Mercuri E., Straub V., Guglieri M., Seferian A.M., Scoto M., Leone D., Koenig E., Khan N., Dugar A., Wang X., Han B., Wang D., Muntoni F. SKIP-NMD Study Group. Long-Term Safety and Efficacy Data of Golodirsén in Ambulatory Patients with Duchenne Muscular Dystrophy Amenable to Exon 53 Skipping: A First-in-human, Multicenter, Two-Part, Open-Label, Phase1/2 Trial // *Nucleic Acid Ther.* – 2022. - Vol. 32, №1. – P. 29-39.

122 Rossi R., Torelli S., Moore M., Ala P., Morgan J., Malhotra J., Muntoni F. Golodirsén restores DMD transcript imbalance in Duchenne Muscular Dystrophy patient muscle cells // *Skelet Muscle.* – 2024. - Vol. 14, №1. – P. 28.

123 Nicolau S., Malhotra J., Kaler M., Magistrado-Coxen P., Iammarino M.A., Reash N.F., Frair E.C., Wijeratne S., Kelly B.J., White P., Lowes L.P., Waldrop M.A., Flanigan K.M. Increase in Full-Length Dystrophin by Exon Skipping in Duchenne Muscular Dystrophy Patients with Single Exon Duplications: An Open-label Study // *J Neuromuscul Dis.* – 2024. - Vol. 11, №3. – P. 679-685.

124 Wang J.H., Gessler D.J., Zhan W., Gallagher T.L., Gao G. Adeno-associated virus as a delivery vector for gene therapy of human diseases // *Signal Transduct Target Ther.* – 2024. - Vol. 9, №1. – P. 78.

125 Mendell J.R., Al-Zaidy S.A., Rodino-Klapac L.R., Goodspeed K., Gray S.J., Kay C.N., Boye S.L., Boye S.E., George L.A., Salazarria S., Corti M., Byrne B.J., Tremblay J.P. Current Clinical Applications of In Vivo Gene Therapy with AAVs // *Mol Ther.* – 2021. - Vol. 29, №2. – P. 464-488.

126 Cope H., Fischer R., Heslop E., McNiff M., Johnson A., Camino E., Denger B., Armstrong N., Thakrar S., Bateman-House A., Beaverson K.L., Woollacott I.O., Phillips D., Fernandez V., Ganot A., Donisa-Dregghici R., Mansfield C., Peay H. Clinician Perspectives of Gene Therapy as a Treatment Option for Duchenne Muscular Dystrophy // *J Neuromuscul Dis.* – 2024. - Vol. 11, №5. – P. 1085-1093.

127 Wang J.H., Gessler D.J., Zhan W., Gallagher T.L., Gao G. Adeno-associated virus as a delivery vector for gene therapy of human diseases // *Signal Transduct Target Ther.* – 2024. - Vol. 9, №1. – P. 78.

128 Mendell J.R., Al-Zaidy S.A., Rodino-Klapac L.R., Goodspeed K., Gray S.J., Kay C.N., Boye S.L., Boye S.E., George L.A., Salazarria S., Corti M., Byrne B.J., Tremblay J.P. Current Clinical Applications of In Vivo Gene Therapy with AAVs // *Mol Ther.* – 2021. - Vol. 29, №2. – P. 464-488.

129 Cope H., Fischer R., Heslop E., McNiff M., Johnson A., Camino E., Denger B., Armstrong N., Thakrar S., Bateman-House A., Beaverson K.L., Woollacott I.O.C., Phillips D., Fernandez V., Ganot A., Donisa-Dregghici R., Mansfield C., Peay H. Clinician Perspectives of Gene Therapy as a Treatment Option for Duchenne Muscular Dystrophy // *J Neuromuscul Dis.* – 2024. - Vol. 11, №5. – P. 1085-1093.

130 Hart C.C., Lee Y.I., Xie J., Gao G., Lin B.L., Hammers D.W., Sweeney H.L. Potential limitations of microdystrophin gene therapy for Duchenne muscular

dystrophy // JCI Insight. – 2024. - Vol. 9, №11. – P. 165869.

131 Gomez Limia C., Baird M., Schwartz M., Saxena S., Meyer K., Wein N. Emerging Perspectives on Gene Therapy Delivery for Neurodegenerative and Neuromuscular Disorders // J Pers Med. – 2022. - Vol. 12, №12. – P. 1979.

132 Jiang F., Zhang C., Liu W., Liu F., Huang H., Tan Y., Qin B. Bibliometric analysis of global research trends in adeno-associated virus vector for gene therapy (1991-2022) // Front Cell Infect Microbiol. – 2023. - Vol. 13. – P. 130.

133 Zaidman C.M., Goedeker N.L., Aqul A.A., Butterfield R.J., Connolly A.M., Crystal R.G., Godwin K.E., Hor K.N., Mathews K.D., Proud C.M., Kula Smyth E., Veerapandiyan A., Watkins P.B., Mendell J.R. Management of Select Adverse Events Following DelandistrogeneMoxeparvovec Gene Therapy for Patients With Duchenne Muscular Dystrophy // J Neuromuscul Dis. – 2024. - Vol. 11, №3. – P. 687-699.

134 Birch S.M., Lawlor M.W., Conlon T.J., Guo L.J., Crudele J.M., Hawkins E.C., Nghiem P.P., Ahn M., Meng H., Beatka M.J., Fickau B.A., Prieto J.C., Styner M.A., Struharik M.J., Shanks C., Brown K.J., Golebiowski D., Bettis A.K., Balog-Alvarez C.J., Clement N., Coleman K.E., Corti M., Pan X., Hauschka S.D., Gonzalez J.P., Morris C.A., Schneider J.S., Duan D., Chamberlain J.S., Byrne B.J., Kornegay J.N. Assessment of systemic AAV-microdystrophin gene therapy in the GRMD model of Duchenne muscular dystrophy // Sci Transl Med. – 2023. - Vol. 15, №677. – P. 1815.

135 Birch S.M., Lawlor M.W., Conlon T.J., Guo L.J., Crudele J.M., Hawkins E.C., Nghiem P.P., Ahn M., Meng H., Beatka M.J., Fickau B.A., Prieto J.C., Styner M.A., Struharik M.J., Shanks C., Brown K.J., Golebiowski D., Bettis A.K., Balog-Alvarez C.J., Clement N., Coleman K.E., Corti M., Pan X., Hauschka S.D., Gonzalez J.P., Morris C.A., Schneider J.S., Duan D., Chamberlain J.S., Byrne B.J., Kornegay J.N. Assessment of systemic AAV-microdystrophin gene therapy in the GRMD model of Duchenne muscular dystrophy // Sci Transl Med. – 2023. - Vol. 15, №677. – P. 1815.

136 Arjomandnejad M., Dasgupta I., Flotte T.R., Keeler A.M. Immunogenicity of Recombinant Adeno-Associated Virus(AAV) Vectors for Gene Transfer // BioDrugs. – 2023. - Vol. 37, №3. – P. 311-329.

137 Mendell J.R., Muntoni F., McDonald C.M., Mercuri E.M., Ciafaloni E., Komaki H., Leon-Astudillo C., Nascimento A., Proud C., Schara-Schmidt U., Veerapandiyan A., Zaidman C.M., Guridi M., Murphy A.P., Reid C., Wandel C., Asher D.R., Darton E., Mason S., Potter R.A., Singh T., Zhang W., Fontoura P., Elkins J.S., Rodino-Klapac L.R. AAV gene therapy for Duchenne muscular dystrophy: the EMBARK phase 3 randomized trial // Nat Med. – 2025. - Vol. 31, №1. – P. 332-341.

138 Zwi-Dantsis L., Mohamed S., Massaro G., Moeendarbary E. Adeno-Associated Virus Vectors: Principles, Practices, and Prospects in Gene Therapy // Viruses. – 2025. - Vol. 17, №2. – P. 239.

139 Bez Batti Angulski A., Hosny N., Cohen H., Martin A.A., Hahn D., Bauer J., Metzger J.M. Duchenne muscular dystrophy: disease mechanism and therapeutic strategies // Front Physiol. – 2023. - Vol. 14. – P. 1183101.

- 140 Salari N., Fatahi B., Valipour E., Kazeminia M., Fatahian R., Kiaei A., Shohaimi S., Mohammadi M. Global prevalence of Duchenne and Becker muscular dystrophy: a systematic review and meta-analysis // J Orthop Surg Res. – 2022. - Vol. 17, №1. – P. 96.
- 141 Bayat F., Sarmiento I.G., Ahmadian N., Dehghani Z. Iranian Registry of Duchenne and Becker Muscular Dystrophies: Characterization and Preliminary Data // J Neuromuscul Dis. – 2021. - Vol. 8, №2. – P. 251-259.
- 142 Kumar D., Thomas P.T., Kumar G.S., Sahoo S.K., Sadasivan A., Vengalil S., Nalini A. The struggle to belong: a qualitative exploration of challenges in social spaces faced by children with Duchenne muscular dystrophy attending neuromuscular disorders clinic // DisabilRehabil. – 2025. - Vol. 47, №9. – P. 2358-2365.
- 143 Gholamreza Zamani, Sareh Hosseinpour, Mahmoud Reza Ashraf, Mahmoud Mohammadi, Reza Shervin Badv, Ali Reza Tavasoli, Masood Ghahvechi Akbari, Ali Hosseini Bereshneh, Reza Azizi Malamiriand Morteza HeidariCharacteristics of disease progression and genetic correlation in ambulatory Iranian boys with Duchenne muscular dystrophy // BMC Neurology. – 2022. - Vol. 22. – P. 162.
- 144 Kyrychenko V., Kyrychenko S., Tiburcy M., Shelton J.M., Long C., Schneider J.W., Zimmermann W.H., Bassel-Duby R., Olson E.N. Functional correction of dystrophin actin binding domain mutations by genome editing // JCI Insight. – 2017. - Vol. 2, №18. - P. 95918.
- 145 Gatto F., Benemei S., Piluso G., Bello L. The complex landscape of DMD mutations moving towards personalized medicine //Front.Genetics. - 2024. - Vol. 15. – P. 202.
- 146 Zamani G., Heidari M., Malamiri Azizi R., Ashrafi M.R., Mohammadi M., Shervin Badv R., Fathi M.R. The quality of life in boys with Duchenne muscular dystrophy // Neuromuscular Disorders. – 2016. - Vol. 26, №7. – P. 423–427.
- 147 Flanigan K.M. Duchenne and Becker muscular dystrophies // Neurol Clin. – 2014. - Vol. 32, №3. – P. 671-688.
- 148 Van den Bergen J.C., Wokke B.H., Janson A.A., Van Duinen S.G., Hulsker M.A., Ginjaar H.B., Van Deutekom J.C., Aartsma-Rus A., Kan H.E., Verschuuren J.J. Dystrophin levels and clinical severity in Becker muscular dystrophy patients // J Neurol Neurosurg Psychiatry. – 2014. - Vol. 85, №7. – P. 747-753.
- 149 Wein N., Vulin A., Falzarano M.S., Szigyarto C.A., Maiti B., Findlay A., Heller K.N., Uhlén M., Bakthavachalu B., Messina S., Vita G., Passarelli C., Brioschi S., Bovolenta M., Neri M., Gualandi F., Wilton S.D., Rodino-Klapac L.R., Yang L., Dunn D.M., Schoenberg D.R., Weiss R.B., Howard M.T., Ferlini A., Flanigan K.M. Translation from a DMD exon 5 IRES results in a functional dystrophin isoform that attenuates dystrophinopathy in humans and mice // Nat Med. – 2014. - Vol. 20, №9. – P. 992-1000.
- 150 Scaglioni D., CatapanoF.,EllisM.,Torelli S. The administration of antisense oligonucleotide golodirsen reduces pathological regeneration in patients with Duchenne muscular dystrophy // Acta neuropatholcommun. – 2021. - Vol. 9. – P. 7.

- 151 Shimizu-Motohashi Y., Murakami T., Kimura E., Komaki H. Exon skipping for Duchenne muscular dystrophy: a systematic review and meta-analysis // *Orphanet Journal of Rare Diseases*. – 2018. - Vol. 13. – P. 93.
- 152 Duan D. Systemic AAV Micro-dystrophin Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy // *Mol Ther*. – 2018. - Vol. 26, №10. – P. 2337-2356.
- 153 Mendell J.R., Sahenk Z., Lehman K. Assessment of Systemic Delivery of rAAVrh74. MHCK7. Micro-dystrophin in Children with Duchenne Muscular Dystrophy a Nonrandomized Controlled Trial // *JAMA Neurol*. – 2020. - №1. – P. 19-24.
- 154 Jin M., Lin J., Li H., Li Z., Yang D., Wang Y., Yu Y., Shao Z., Chen L., Wang Z., Zhang Y., Zhang X., Wang N., Xu C., Yang H., Chen W.J., Li G. Correction of human nonsense mutation via adenine base editing for Duchenne muscular dystrophy treatment in mouse // *Mol Ther Nucleic Acids*. – 2024. - Vol. 35, №2. – P. 102165.
- 155 Bertoni C., Namgoong J. Clinical potential of ataluren in the treatment of Duchenne muscular dystrophy // *Degenerative Neurological and Neuromuscular Disease*. - 2016. - №1. – P. 37.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Акт внедрения

СОГЛАСОВАНО

Руководитель Актюбинского
Областного управления
Здравоохранения



Р.К. Исаев

2021 г.

СОГЛАСОВАНО

Проректор по стратегическому развитию,
науке и международному сотрудничеству,
член Правления ЗКМУ имени Марата Оспанова



С.С.Сапарбаев

2021 г.

АКТ № 134

внедрения научно-исследовательской работы

ГКП «Центр семейной медицины» на ПХВ

Наименование предложения медико-генетическое консультирование пациентов с миодистрофией Дюшенна и их семей для оценки генетического риска повторения заболевания (генетический прогноз), определения способов диагностики и профилактики, объяснения смысла собранной и проанализированной медико-генетической информации.

Работа включена в научно-исследовательскую работу ЗКМУ им. М.Оспанова

Форма внедрения: подготовка на рабочем месте.

Ответственный за внедрение и исполнитель: Умурзакова А.О., Аяганов Д.Н.

Эффективность внедрения: Лечебно-диагностическая.

Предложения, замечания учреждения, осуществляющего внедрение. Медико-генетическое консультирование обеспечит раннюю пренатальную диагностику, что в свою очередь, снизит раннюю неврологическую инвалидность у пациентов с миодистрофией Дюшенна.

Срок внедрения IV-V.2021 года

Председатель комиссии: заведующий отделением ГКП

Члены (ответственные за внедрение):



Изимова Г.К.

Баекенова Б.К.

Дарбаева Д.Б.

Исполнители: докторант, ассистент кафедры неврологии с курсом психиатрии и наркологии
Умурзакова А.О.

PhD, руководитель кафедры неврологии с курсом психиатрии и наркологии
Аяганов Д.Н.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Акт внедрения

СОГЛАСОВАНО

Руководитель Актюбинского
Областного управления
Здравоохранения

Р.К. Исаев

2021 г.



СОГЛАСОВАНО

Проректор по стратегическому развитию,
науке и международному сотрудничеству,
член Правления ЗКМУ имени Марата Оспанова

С.С. Сапарбаев

2021 г.



АКТ № 135

внедрения научно-исследовательской работы
ГКП «Центр семейной медицины» на ПХВ

Наименование предложения Применение «теста 6MWT», «шкалы Vignos», «Времени для симптома Говерса» для функциональной оценки детей с миодистрофией Дюшенна в условиях ПМСП при первичном осмотре.

Работа включена в научно-исследовательскую работу ЗКМУ им. М.Оспанова

Форма внедрения: подготовка на рабочем месте.

Ответственный за внедрение и исполнитель: Умурзакова А.О., Аяганов Д.Н.

Эффективность внедрения: Лечебно-диагностическая.

Предложения, замечания учреждения, осуществляющего внедрение, предложения
Применение функциональных шкал обеспечит своевременную оценку в динамике тяжести прогрессирования мышечной слабости и утомляемости у пациентов с МДД с сохранной способностью к самостоятельному передвижению, оценит эффективность симптоматической, генетической, гормональной терапий.

Срок внедрения IV-V.2021 года

Председатель комиссии: заведующий отделением ВОП

Изимова Г.К.

Члены (ответственные за внедрение):

Сейтмагулова А.Н.

Наринова Б.А.

Исполнители: докторант, ассистент кафедры неврологии с курсом психиатрии и наркологии
Умурзакова А.О.

PhD, руководитель кафедры неврологии с курсом психиатрии и наркологии
Аяганов Д.Н.



И ПРО БКМУ 605-03-2020. Ылымы-жерттеу жұмысын ендіру акті. Алтыншы басылым.

Ф ПРО ЗКМУ 605-03-2020. Акт внедрения научно-исследовательской работы. Издание шестое.

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Акт внедрения

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по учебно-воспитательной работе
ЗКМУ им. Марата Оспанова
А.К. Исмагулова
«29» 10 2021 г.

АКТ
внедрения по учебно-методической работе
№ 1 «29» 10 2021 г.

Основание: протокол заседания кафедры № 2 «23 сентября» 2021 г.
Место проведения: НАО «Западно-Казахстанский медицинский университет имени М.Оспанова»
кафедра неврологии с курсом психиатрии и наркологии.

Наименование нововведения: «Современные стратегии диагностики и лечения при нервно-мышечных заболеваниях» по результатам диссертационного исследования Умурзаковой А.О. на тему: «Клинико-генетические характеристики миодистрофии Дюшенна в Республике Казахстан».
Содержание внедрения: внедрение блока: «Современные стратегии диагностики и лечения при нервно-мышечных заболеваниях» и содержание практического занятия на тему: «Наследственные нервно-мышечные заболевания» для студентов 5 курса и врачам практического здравоохранения (детские неврологи, ВОП, педиатры, реабилитологи).

Работа выполнена: на кафедре неврологии с курсом психиатрии и наркологии

Специальность: «Общая медицина»

Дисциплина: Неврология

Сроки внедрения: 2021-2022 гг.

Эффективность внедрения: внедрение блока «Современные стратегии диагностики и лечения при нервно-мышечных заболеваниях» и содержание практического занятия на тему: «Наследственные нервно-мышечные заболевания» для студентов 5 курса и врачам практического здравоохранения (детские неврологи, ВОП, педиатры, реабилитологи) способствует углублению знаний студентов 5 курса и врачей практического здравоохранения о современном состоянии проблемы диагностики, о достижениях в диагностике и лечения при нервно-мышечных заболеваниях, разработке навыков ведения больных с нервно-мышечной патологией.

Предложения, замечания, осуществляющего внедрение: предложение PhD Аяганова Д.Н., м.м.н. Умурзаковой А.О. имеет практическую ценность, методически эффективно и может быть рекомендовано к внедрению на уровне кафедры.

Руководитель кафедры неврологии с курсом психиатрии и наркологии, PhD
Аяганов Д.Н. Аяганов

Исполнитель: руководитель кафедры неврологии с курсом психиатрии и наркологии, PhD

Аяганов Д.Н. Аяганов

Исполнитель: ассистент кафедры неврологии с курсом психиатрии и наркологии

Умурзакова А.О. Умурза

СОГЛАСОВАНО

Руководитель ДАР,

PhD Алексенова Н.У. Алексенова

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Акт внедрения

СОГЛАСОВАНО

Руководитель Актюбинского
Областного управления
Здравоохранения

Р.К. Исаев

2022 г.



СОГЛАСОВАНО

Проректор по стратегическому развитию,
науке и международному сотрудничеству,
член Правления ЗКМУ имени Марата Оспанова

С.С.Сапарбаев

2022 г.



АКТ № 265

внедрения научно-исследовательской работы
ГКП «Городская поликлиника №5» на ПХВ

Наименование предложения: оценка функций нижних и верхних конечностей при помощи шкал Brooke, P.J.Vignos у пациентов с прогрессирующей мышечной дистрофией Дюшенна для анализа уровня прогрессирования заболевания

Работа включена в научно-исследовательскую работу ЗКМУ им. М.Оспанова

Форма внедрения: подготовка на рабочем месте.

Ответственный за внедрение и исполнитель: Умурзакова А.О., Аяганов Д.Н.

Эффективность внедрения: лечебно-диагностическая.

Предложения, замечания учреждения, осуществляющего внедрение. Оценка функций нижних и верхних конечностей при помощи шкал Brooke, P.J.Vignos обеспечит раннюю профилактику неамбулаторности пациентов с прогрессирующей мышечной дистрофией Дюшенна.

Срок внедрения: XI-XII.2022 года

Председатель комиссии: заведующий отделением ВОП 2 Изимова Г.К.

Члены (ответственные за внедрение): ВОП Мухамбедиярова Д.С.

ВОП Ескалиева А.Б.

Исполнители: ассистент кафедры неврологии с курсом психиатрии и наркологии

Умурзакова А.О.

PhD, руководитель кафедры неврологии с курсом психиатрии и наркологии

Аяганов Д.Н.



Н ПРО БКМУ 605-03-2020. Ғылыми-зерттеу жұмысын ендіру акті. Алтыншы басылым.
Ф ПРО ЗКМУ 605-03-2020. Акт внедрения научно-исследовательской работы. Издание шестое.

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата (Листок-вкладыш)

▼ Лекарственный препарат подлежит дополнительному мониторингу, который способствует быстрому выявлению новых сведений о безопасности. Это позволит в короткий срок выявить новую информацию о безопасности. Обращаемся к работникам системы здравоохранения с просьбой сообщать о любых подозреваемых нежелательных реакциях

Инструкция по медицинскому применению орфанного препарата будет обновляться по мере необходимости новой информацией о данном лекарственном средстве.

Торговое наименование

ТрансларнаTM

Международное непатентованное название

Аталурен

Лекарственная форма, дозировка

гранулы для приготовления суспензии для приема внутрь,
125 мг, 250 мг и 1000 мг

Фармакотерапевтическая группа

Костно-мышечная система. Препараты для лечения заболеваний опорно-двигательного аппарата другие. Препараты для лечения заболеваний опорно-двигательного аппарата прочие. Аталурен.

Код АТХ M09AX03

Показания к применению

Трансларна назначается ходячим пациентам в возрасте от 2 лет и старше для лечения мышечной дистрофии Дюшенна, вызываемой нонсенс-мутацией (бессмысленной мутацией) гена дистрофина. Эффективность при лечении лежачих пациентов не демонстрировалась.

Наличие нонсенс-мутации гена дистрофина должно быть установлено посредством генетического исследования .

Перечень сведений, необходимых до начала применения

Противопоказания

- повышенная чувствительность к активному веществу Аталурен или любым вспомогательным веществам, перечисленным в разделе состав лекарственного препарата

-сочетанное применение с внутривенными антибиотиками группы аминогликозидов

- беременность и период лактации
- детский возраст до 2 лет.

Необходимые меры предосторожности при применении

Пациенты, у которых не имеется нонсенс-мутации

Нонсенс-мутация в гене дистрофина, выявляемая путем генетических исследований, должна присутствовать в анамнезе пациента. Если у пациента не имеется нонсенс-мутации, ему не следует принимать аталурен.

Почечная недостаточность

У пациентов с тяжелой почечной недостаточностью (eGFR<30 мл / мин) сообщалось об увеличении воздействия аталурена и метаболита аталурена. Токсичность метаболита неизвестна. Более высокое воздействие аталурена было связано с потенциальным снижением эффективности. Поэтому пациентов с тяжелой почечной недостаточностью или терминальной стадией почечной недостаточности следует лечить аталуреном только в том случае, если ожидаемая клиническая польза превышает потенциальный риск, и следует внимательно следить за возможной токсичностью метаболитов и снижением эффективности. Следует рассмотреть более низкие дозы аталурена. Не следует начинать лечение у ранее нелеченных пациентов с СКФ <30 мл / мин

Изменения уровня липидов

Так как об изменениях в уровнях липидов некоторых пациентов (повышенное содержание триглицеридов и холестерина) сообщалось во время клинических испытаний, рекомендуется на ежегодной основе отслеживать уровни общего холестерина, ЛПНП, ЛПВП и триглицеридов у пациентов, страдающих от вызываемой нонсенс-мутацией мышечной дистрофии Дюшенна (нмМДД) и получающих аталурен; объем мониторинга может быть увеличен в зависимости от клинического состояния пациента.

Гипертония в результате сочетанного применения с системными кортикостероидами

Так как о гипертонии в результате сочетанного применения с системными кортикостероидами сообщалось в случае некоторых пациентов во время клинических испытаний, рекомендуется отслеживать систолическое и диастолическое артериальное давление каждые 6 месяцев в состоянии покоя у пациентов страдающих от нмМДД и получающих аталурен в сочетании с кортикостероидами; объем мониторинга может быть увеличен в зависимости от клинического состояния пациента.

Мониторинг функций почек

Ввиду поступления информации о небольшом повышении средних уровней сывороточного креатинина, азота мочевины в крови и цистатина С в ходе контролируемых исследований нмМДД, рекомендуется каждые 6-12

месяцев отслеживать уровни сывороточного креатинина, азота мочевины в крови и цистатина С у пациентов, страдающих от нМДД и получающих аталурен; объем мониторинга может быть увеличен в зависимости от клинического состояния пациента.

Потенциальные взаимодействия с другими лекарственными средствами

Следует с осторожностью совмещать аталурен с лекарственными средствами, являющимися стимуляторами уридин-дифосфат-глюкоронилтрансферазы, UGT1A9, или субстратами OAT1 и OAT3

Аминогликозиды

В ходе лабораторных исследований было установлено, что аминогликозиды снижают способность аталурена к прочитыванию терминаторов. Кроме того, было обнаружено, что аталурен повышает почечную токсичность внутривенных аминогликозидов. Следует избегать сочетанного применения таких лекарственных средств с аталуреном. Так как механизм повышения аталуреном нефротоксичности внутривенных аминогликозидов неизвестен, сочетанное применение иных нефротоксичных лекарственных средств с аталуреном также не рекомендуется. Если такая ситуация неизбежна (например, при использовании ванкомицина для лечения метициллин-устойчивого золотистого стафилококка), следует тщательно отслеживать почечные функции.

Взаимодействия с другими лекарственными препаратами

Аминогликозиды

Аталурен не следует сочетанно применять с внутривенными аминогликозидами, так как во время клинических испытаний у пациентов с кистозным фиброзом аталурен вызывал нарушения почечной функции.

Поэтому, если возникает необходимость применения внутривенных аминогликозидов, терапия при помощи ТрансларнаTM должна быть прекращена, и может быть продолжена спустя 2 дня после окончания курса аминогликозидов. Эффект сочетанного применения аталурена с иными нефротоксичными лекарственными средствами неизвестен.

У нескольких пациентов с вызванным нонсенс-мутацией кистозным фиброзом, принимавших аталурен совместно с внутривенными аминогликозидами и рядом антибиотиков для лечения осложнений кистозного фиброза, наблюдался рост уровней сывороточного креатинина. Во всех случаях показатели сывороточного креатинина вернулись в норму после прекращения применения внутривенных аминогликозидов и продолжения или прекращения применения ТрансларнаTM. Эти данные говорят о том, что сочетанное применение ТрансларнаTM и внутривенных аминогликозидов может усиливать нефротоксическое воздействие аминогликозидов.

Некоторые из этих случаев могли быть усугублены обезвоживанием. Пациентам следует поддерживать водный баланс организма при приеме ТрансларнаTM.

Воздействие других лекарственных средств на фармакокинетику аталурена

По данным лабораторных исследований, аталурен является субстратом UGT1A9 (уридин-дифосфат-глюкоронилтрансфераза, изоформа 1A9). Сочетанное применение рифампицина, мощного стимулятора метаболических энзимов, включая UGT1A9, снижает экспозицию аталурена на 29%. Значение этих факторов для человека неизвестно. Следует с осторожностью применять аталурен совместно с лекарственными средствами, являющимися стимуляторами UGT1A9 (например, рифампицином).

Воздействие аталурена на фармакокинетику других лекарственных средств

По данным лабораторных исследований, аталурен обладает потенциалом к ингибированию уридин-дифосфат-глюкоронилтрансферазы, изоформа 1A9 (UGT1A9), белков, переносящих органические анионы человека, 1 и 3 типов (OAT1 и OAT3), или полипептида, переносящего органические анионы 1B3 (OATP1B3). Сочетанное применение аталурена с микофенолата мофетилем у здоровых добровольцев не повлияло на экспозицию его активного метаболита, микофеноловой кислоты (субстрата UGT1A9). При сочетанном применении аталурена с лекарственными средствами, являющимися субстратами UGT1A9, не требуется корректировка дозы.

В клиническом исследовании по оценке способности аталурена ингибировать транспортную систему OATP1B3 с использованием разовой дозы телмисартана 80 мг, селективного субстрата OATP1B3 *in vitro*, аталурен увеличил воздействие телмисартана на 28%. Этот эффект считается клинически несущественным. Тем не менее, магнитуа данного эффекта может быть больше для дозы телмисартана 40 мг.

Поэтому следует с осторожностью применять аталурен совместно с лекарственными средствами, являющимися субстратами OAT1 или OATP1B3, по причине риска повышения концентрации этих лекарственных средств (например, оселтамивир, ацикловир, каптоприл, фуросемид, буметанид, валсартан, правастатин, росувастатин, аторвастатин, питавастатин). Следует также с осторожностью сочетать аталурен с субстратами OAT3 (например, ципрофлоксацином), особенно с субстратами OAT3 с узким терапевтическим диапазоном. В одном из клинических исследований экспозиция ципрофлоксацина в присутствии аталурена повысилась на 32%. В другом клиническом исследовании экспозиция адефовира в присутствии аталурена возросла на 60%. Следует с осторожностью применять аталурен совместно с адефовиром.

По данным лабораторных исследований, аталурен не является ингибитором переноса при помощи цитохрома гликопротеина-P или метаболизма, проистекающего при помощи P450. Точно также, *in vivo* аталурен не выступает стимулятором изоэнзимов цитохрома P450.

Сочетанное применение кортикостероидов (дефлазакорт, преднизон или преднизолон) с аталуреном не влияет на плазменную концентрацию аталурена.

Не было выявлено никаких клинически значимых изменений в плазменной концентрации кортикостероидов при сочетанном применении с аталуреном. Эти данные указывают на отсутствие явного взаимодействия между кортикостероидами и аталуреном, и корректировка дозы не требуется.

Лекарственные средства, воздействующие на транспортер гликопротеина-Р

В лабораторных условиях аталурен не является субстратом транспортера гликопротеина-Р. Не ожидается, что на фармакокинетику аталурена будут воздействовать лекарственные средства, ингибирующие транспортер гликопротеина-Р.

Специальные предупреждения

Применение в педиатрии

Безопасность и эффективность препарата "Трансларна" для детей с массой тела менее 12 кг и возраста от 6 месяцев до 2 лет в данный момент не установлена. Данные отсутствуют.

Во время беременности или лактации

Не имеется значимых данных об использовании аталурена беременными женщинами. В качестве меры предосторожности, во время беременности принимать аталурен не рекомендуется.

Неизвестно выделяется ли аталурен или его метаболиты в материнское молоко. Нельзя исключать риск для новорожденных/младенцев. Во время терапии аталуреном грудное вскармливание следует прекратить.

Особенности влияния препарата на способность управлять транспортным средством или потенциально опасными механизмами

Воздействие аталурена на способность управлять автомобилем, велосипедом или использовать механизмы не исследовалось. Пациентам, испытывающим головокружение, следует управлять автомобилем, велосипедом или использовать механизмы с осторожностью.

Рекомендации по применению

Режим дозирования

Рекомендуемая доза составляет 10 мг/кг массы тела утром, 10 мг/кг массы тела в обеденное время, и 20 мг/кг массы тела вечером (с тем, чтобы общая суточная доза составила 40 мг/кг массы тела).

Лекарственное средство ТрансларнаTM доступно в саше по 125, 250 и 1000 мг. В таблице приведена информация, помогающая подобрать дозу с учетом массы тела.

Таблица Д 1

Диапазон массы тела (кг)		Количество саше								
		Утро			День			Вечер		
		125 мг саше	250 мг саше	1000 мг саше	125 мг саше	250 мг саше	1000 мг саше	125 мг саше	250 мг саше	1000 мг саше
12	14	1	0	0	1	0	0	0	1	0
15	16	1	0	0	1	0	0	1	1	0
17	20	0	1	0	0	1	0	0	1	0
21	23	0	1	0	0	1	0	1	1	0
24	26	0	1	0	0	1	0	0	2	0
27	31	0	1	0	0	1	0	1	2	0
32	35	1	1	0	1	1	0	1	2	0
36	39	1	1	0	1	1	0	0	3	0
40	44	1	1	0	1	1	0	1	3	0
45	46	0	2	0	0	2	0	1	3	0
47	55	0	2	0	0	2	0	0	0	1
56	62	0	2	0	0	2	0	0	1	1
63	69	0	3	0	0	3	0	0	1	1
70	78	0	3	0	0	3	0	0	2	1
79	86	0	3	0	0	3	0	0	3	1
87	93	0	0	1	0	0	1	0	3	1
94	105	0	0	1	0	0	1	0	0	2
106	111	0	0	1	0	0	1	0	1	2
112	118	0	1	1	0	1	1	0	1	2
119	125	0	1	1	0	1	1	0	2	2

Метод и путь введения**Способ применения**

Препарат "Трансларна" предназначен для приема внутрь, после приготовления из него суспензии посредством смешивания с жидкой или полутвердой пищей. Саше следует открывать только в момент приготовления дозы. Полное содержимое каждого саше следует смешивать с не менее 30 мл жидкости (вода, молоко, фруктовый сок) или 3 столовыми ложками полутвердой пищи (йогурт или яблочное пюре). Приготовленную дозу следует хорошо перемешать перед приемом. Объем жидкости или полутвердой пищи можно увеличить при желании пациента. Пациент должен принять дозу полностью.

Частота применения с указанием времени приема

Для приема внутрь, по 3 дозы аталурена в день.

Первая доза принимается утром, вторая в обеденное время, третья вечером. Рекомендваемый промежуток составляет 6 часов между утренней и обеденной дозами, 6 часов между обеденной и вечерней дозами и 12 часов между вечерней дозой и следующей утренней дозой.

Длительность лечения

Лечение следует начинать под наблюдением врача-специалиста, имеющего опыт в лечении мышечной дистрофии Дюшенна/Беккера. Не останавливать прием ТрансларнаTM без обсуждения с вашим доктором. Если у вас есть какие-либо дополнительные вопросы относительно использования этого лекарства, спросите своего доктора.

Особые категории пациентов

Пациенты пожилого возраста

Безопасность и эффективность аталурена для пациентов старше 65 лет в данный момент не установлены .

Пациенты с нарушением функции почек

Коррекция дозы не требуется для пациентов с почечной недостаточностью легкой или средней степени тяжести. Лечение пациентов с тяжелой почечной недостаточностью (pСКФ<30 мл / мин) или терминальной почечной недостаточностью не рекомендуется.

Пациенты с нарушением функции печени

Для пациентов с легкими, умеренными и тяжелыми нарушениями функции печени не требуется корректировка дозы.

Пациенты детского возраста

Пациентам детского возраста с массой тела 12 кг или более следует принимать лекарственное средство согласно диапазону массы тела (см. таблицу выше). Рекомендуемая доза идентична для всех возрастных категорий, т.е. 10 мг/кг массы тела утром, 10 мг/кг массы тела в обеденное время, и 20 мг/кг массы тела вечером (общая суточная доза - 40 мг/кг массы тела).

Безопасность и эффективность препарата "Трансларна" для детей с массой тела менее 12 кг и возраста от 6 месяцев до 2 лет в данный момент не установлена. Данные отсутствуют.

Меры, которые необходимо принять в случае передозировки

Здоровые добровольцы, получившие однократную пероральную дозу аталурена в объеме 200 мг/кг, испытали преходящие легкие симптомы в виде головной боли, тошноты, рвоты и диареи. Серьезных побочных эффектов отмечено не было. В случае вероятной передозировки следует обеспечить поддерживающий медицинский уход и обратиться за медицинской консультацией к специалисту в целях наблюдения за клиническим состоянием пациента.

Меры, необходимые при пропуске одной или нескольких доз лекарственного препарата

Отложенная или пропущенная доза

Если задержка в приеме дозы аталурена составляет менее 3 часов после принятия утренней или дневной доз или менее 6 часов после принятия вечерней дозы, следующую дозу следует принять без изменений графика. Если задержка в приеме составляет более 3 часов после принятия утренней или дневной доз или более 6 часов после принятия вечерней дозы, следующую дозу принимать не следует, и пациенту необходимо вернуться к обычному графику приема. Пациент не должен принимать двойную или дополнительную дозу, если он пропустил одну из доз по графику. Важно принимать точно отмеренные дозы. Превышение рекомендуемой дозы может привести к снижению эффективности лекарственного средства.

Указание на наличие риска симптомов отмены

Не применимо

Рекомендации по обращению за консультацией к медицинскому работнику для разъяснения способа применения лекарственного препарата

Описание нежелательных реакций, которые проявляются при стандартном применении ЛП и меры, которые следует принять в этом случае (при необходимости)

Побочные реакции у пациентов с нмМДД, получавших рекомендуемую суточную дозу аталурена в объеме 40 мг/кг/день в ходе двух плацебо-контролируемых исследований, приведены внизу. Побочные эффекты, наблюдавшиеся у более чем 1 пациента в группе 40 мг/кг с частотой выше, чем в группе плацебо, представлены по системно-органному классу, предпочитаемому термину для побочной реакции и частоте проявления. Группировка по частоте основана на следующем принципе: очень часто ($\geq 1/10$) и часто (от $\geq 1/100$ до $< 1/10$).

Очень часто

- рвота

Часто

- головная боль

- снижение аппетита, гипертриглицеридемия

- гипертония

- кашель, носовое кровотечение

- тошнота, боль в верхней части живота, метеоризм, неприятные ощущения

в желудке, запор

- эритематозная сыпь

- боль в конечностях, костно-мышечная боль в груди

- гематурия, энурез

Форма выпуска и упаковка

По 500 мг порошка (для дозировки 125 мг), 1000 мг порошка (для дозировки 250 мг) или 4000 мг порошка (для дозировки 1000 мг) помещают в герметично запаиваемый пакетик-саше из алюминиевой фольги.

По 30 саше вместе с инструкцией по медицинскому применению на казахском и русском языках помещают в пачку из картона.

Срок хранения

4 года.

Не применять по истечении срока годности!

Условия хранения

При температуре не выше 30°C. Каждую приготовленную дозу желательно использовать сразу после приготовления. Приготовленную дозу хранят в холодильнике при температуре 2-8°C в течение 24 ч или при комнатной температуре (15-30°C) в течение 3 ч.

Хранить в недоступном для детей месте!

Условия отпуска из аптек

По рецепту.

Сведения о производителе

ROVIPHARMA INDUSTRIAL SERVICE S.A.

Виа Комплутенсе, 140, Алькала де Хенарес, Мадрид 28805, Испания

Тел: +34 673988952, e-mail: rovi@rovi.es

Держатель регистрационного удостоверения

PTC Therapeutics International Limited

5 этаж, Гранд-Канал-Плаза, 3, Аппер-Гранд-Канал-Стрит,

Дублин 4, D04 EE70, Ирландия

Тел: +353 (0)1 906 8700, e-mail: ahopkins@ptcbio.com

Наименование, адрес и контактные данные (телефон, факс, электронная почта) организации на территории Республики Казахстан, принимающей претензии (предложения) по качеству лекарственных средств от потребителей и ответственной за пострегистрационное наблюдение за безопасностью лекарственного средства

Республика Казахстан

Представительство АО «Ген Илачве Саглык Урунлери Санаиве Тиджарет» в Республике Казахстан

г. Алматы 050042, ул. Жандосова 98, БЦ Навои Тауэрс, офис 401

тел.: 8 (727) 3911097, 8 (727) 2434777

тел./факс: 8 (727) 3911097 (внут. 101)

e-mail: infokz@genilac.com

ПРИЛОЖЕНИЕ Е

Шкала «Северная Звезда» - North Star Ambulatory Assessment (NSAA)

Таблица Е 1

Оцениваемое	Комментарии
1	2
1. Положение стоя	Оценке 2 балла соответствует удерживание положения в течение 3 секунд (минимум).
2. Ходьба	Если пациент обычно ходит на цыпочках, но иногда становится на стопу или может встать на нее, когда вы об этом просите, оценка - 1 балл.
3. Подъем со стула	Для достижения правильного исходного положения можно использовать стул или под ногу ступеньку. Если руки скрещены на протяжении всего упражнения, оценка - 2 балла.
4, 5. Положение стоя на одной ноге (правая + левая)	Лучше выполнять на полу, а не на коврике
6, 7. Подъем на ступеньку с правой (левой) ноги	Можно использовать в помощь пациенту регулируемую по высоте опору. При ее отсутствии врач может помочь пациенту одной рукой.
8, 9. Спуск со ступеньки с правой/левой ноги	Можно использовать в помощь пациенту регулируемую по высоте опору. При ее отсутствии врач может помочь пациенту одной рукой.
10. Переход в положение сидя	Если пациент переворачивается на живот или поворачивается к полу, чтобы сесть, поставьте 1 балл.
11. Подъем с пола	Поставьте 1 балл, если ребенок стоит без опоры на мебель, но наблюдается какая-либо часть маневра Говерса.
12. Подъем головы	Попросите пациента скрестить руки на груди при выполнении упражнения: так он не сможет помогать себе руками. Также попросите пациента посмотреть на пальцы ног, чтобы убедиться в том, что шея сгибается. При этом подбородок должен двигаться к груди.

Продолжение таблицы Е 1

1	2
13. Положение стоя на пятках	Чтобы получить оценку 2 балла, необходимо одновременно встать на обе пятки. Если отмечается существенная инверсия, но плюсны приподняты, оценка - 1 балл. Если отмечается инверсия, а латеральная граница стопы находится на полу, оценка - 0 баллов.
14. Прыжок	Требуется движение вверх, а не вперед.
15, 16. Прыжок на одной ноге (правой и левой)	Для оценки 2 балла нужен заметный отрыв от пола.
17. Бег (10 м)	"Походка Дюшенна" - не истинный бег (вероятно, с двойной фазой поддержки), интенсивнее, чем ходьба

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

Модель гена для визуализации локализации мутаций

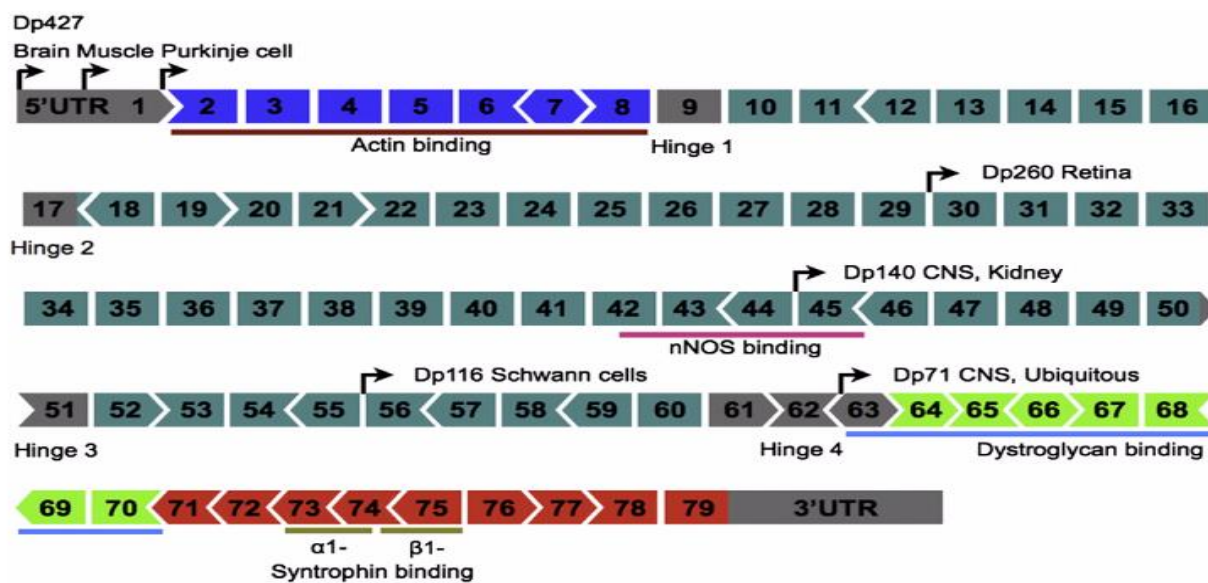


Рисунок Ж 1

Примечание - Адаптировано:
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044743113000535?via%3Dihub>)