

ТРЕТЯК Б. І.✉, ТИРКУС М. Я., БАКУМ Х. Я., ЗАСТАВНА Д. В., АКОПЯН Г. Р.

ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України»,

Україна, 79008, м. Львів, вул. Лисенка, 31а, ORCID: 0000-0001-6425-4497, 0009-0006-9353-4707, 0000-0002-0877-6327, 0000-0002-3858-7180, 0000-0002-6436-1716

✉ irynej@ukr.net, (066) 327-65-80

ДОСЛІДЖЕННЯ ЕКСПАНСІЇ ТРИНУКЛЕОТИДНИХ САG-ПОВТОРІВ ГЕНА АНДРОГЕНОВОГО РЕЦЕПТОРА У ПАЦІЄНТІВ З ПІДОЗРОЮ НА СИНДРОМ КЕННЕДІ

Мета. Провести молекулярно-генетичне дослідження експансії тринуклеотидних повторів гена андрогенового рецептора *AR* в осіб з підозрою на спинобульбарну м'язову атрофію (синдром Кеннеді). **Методи.** Клініко-генеалогічний, метод диференційної діагностики, виділення та очищення ДНК, молекулярно-генетичні: полімеразна ланцюгова реакція, електрофорез в агарозному гелі. **Результати.** Проведено молекулярно-генетичне дослідження експансії тринуклеотидних повторів гена андрогенового рецептора *AR* у 30 осіб з підозрою на синдром Кеннеді. У 5 пробандів досліджуваної групи встановлено 38 САG-повторів (верхня межа норми) та у 27 обстежуваних пацієнтів кількість САG-повторів не перевищувала 37 (норма). Серед обстеженої групи пацієнтів знайдено родину, в якій у трьох чоловіків встановлено 49 САG-повторів у гені *AR*, що засвідчило наявність синдрому Кеннеді. **Висновки.** Синдром Кеннеді – рідкісне Х-зчеплене рецесивне захворювання, що потребує розробки специфічних біомаркерів для з'ясування патогенного процесу та полегшення ранньої діагностики.

Ключові слова: Синдром Кеннеді, ген андрогенового рецептора *AR*, тринуклеотидні САG-повтори.

Спино-бульбарна м'язова атрофія (СБМА), також відома як синдром Кеннеді – Х-зчеплене рецесивне захворювання, що характеризується прогресуючою м'язовою слабкістю. Це рідкісний розлад із поширеністю в Європі від 1 до 2,5/100 000 чоловіків [1]. Значно частіше в порівнянні з іншими етнічними популяціями Синдром Кеннеді зустрічається серед японців, що пояснюється ефектом засновника. Дане захворювання викликане експансією (збільшенням) тринуклеотидних повторів (САG) у першому екзоні гена *AR* андрогенового рецептора. Вважається, що хвороба Кеннеді може вражати лише чоловіків, хоча були описані випадки,

коли гетеро- або гомозиготна експансія САG-повторів у гені *AR* призводила у жінок до появи легкої симптоматики даного захворювання. Вік початку захворювання зазвичай припадає на третє-п'яте десятиліття життя, проте є повідомлення і про ранню маніфестацію [2].

Синдром Кеннеді описується низкою неврологічних порушень, серед яких слабкість у дистальних та проксимальних м'язах, судоми, часті падіння та складності з ходьбою, тремор, атрофія м'язів проксимальних та дистальних відділів, контрактура суглобів, порушення ковтання та мови, слабкості дихальної мускулатури. Серед ендокринних розладів відзначається зниження чутливості до андрогенів: гінекомастія, атрофія яєчок, оліго- або азооспермія [3].

Діагноз спинобульбарна м'язова атрофія (Синдром Кеннеді) підтверджується за допомогою молекулярно-генетичного тестування у чоловіків, що мають у гені *AR* > 39 повторів САG. Ген *AR* (англ. *androgen receptor*) локалізований на довгому плечі Х-хромосоми (Xq11-12) та кодує амінокислотну послідовність білка андрогенового рецептора, який активується під дією тестостерону та дигідротестостерону і є транскрипційним фактором [4]. Ген *AR* складається з восьми екзонів, що кодують чотири білкові домени: домен активації транскрипції (екзон 1), ДНК-зв'язуючий домен (екзони 2 і 3), петльовий домен, що складається з двох елементів «цинкових пальців» (екзон 4), та гормонзв'язуючий домен (екзони 5-8). Для гена *AR* характерна наявність у 1-му екзоні послідовності повторів САG (цитозин-аденін-гуанін), кількість яких може значно змінюватись (від 8 до 25) у різних людей. Триплет САG кодує амінокислоту глутамін, і при зміні кількості нуклеотидів САG-повторів змінюється відповідно і кількість амінокислоти глутаміну в білку. Дослідження показують, що меншій кількості САG-повторів відповідає менший ступінь конформаційних змін рецептора і, як наслідок, більший ступінь зв'язку в комплексі гормон-рецептор,

© ТРЕТЯК Б. І., ТИРКУС М. Я., БАКУМ Х. Я., ЗАСТАВНА Д. В., АКОПЯН Г. Р.

що призводить до активації транскрипції. Зі збільшенням кількості CAG-повторів транскрипційна активність AR падає. Незважаючи на те, що збільшення CAG-повторів змінює структуру андрогенового рецептора (AR), незрозуміло, як змінений білок порушує нервові клітини головного та спинного мозку. Дослідження показали, що фрагмент білка AR, що містить сегмент CAG, накопичується в цих клітинах, перешкоджаючи нормальному функціонуванню клітин [5].

Розмір експансії корелює з тяжкістю симптоматики, рівнем пенетрантності та часом перших проявів захворювання [6]. Існує зворотна кореляція між кількістю повторів CAG і віком появи симптомів синдрому Кеннеді. Якщо розглядати немоторні прояви, цей зв'язок неочевидний. Кореляція між кількістю повторів CAG і руховою недостатністю може становити лише 60 % спостережуваної клінічної гетерогенності, що вказує на наявність інших факторів: генетичних, епігенетичних або екологічних, що відіграють важливу роль у розвитку клінічного синдрому. Прикладом цього є наявність значної фенотипової варіабельності в межах однієї родини, незважаючи на однакову кількість повторів CAG [7]. Кореляційний аналіз між кількістю повторів CAG та електрофізіологічними індексами був непослідовним. Вважається, що висока кількість повторів переважно пов'язана з руховими аномаліями, тоді як низька кількість повторів в основному проявляється в сенсорних змінах. Важливо відзначити, що від початку слабкості до діагностики спинобульбарної м'язової атрофії в середньому проходить понад 5 років [8]. Таким чином, існує критична потреба в розробці специфічних для захворювання біомаркерів, для з'ясування патогенного процесу, а також полегшення ранньої діагностики СБМА.

Метою даного дослідження було провести молекулярно-генетичне дослідження експансії тринуклеотидних повторів гена андрогенового рецептора AR в осіб з підозрою на спинобульбарну м'язову атрофію (синдром Кеннеді).

Матеріали і методи

Матеріалом дослідження слугували зразки ДНК, виділені з клітин периферійної крові пацієнтів з підозрою на синдром Кеннеді, які обстежувались у Львівському обласному медико-

генетичному центрі ДУ «Інститут спадкової патології НАМНУ». Виділення та очищення ДНК з лейкоцитів периферійної крові проводили методом висолювання. Аналіз кількості CAG-повторів у 1-му екзоні гена AR проводили за допомогою ПЛР [9]. Для фланкування досліджуваної ділянки гена використовували наступні праймери (табл. 1).

Результати та обговорення

На підставі клінічних, генеалогічних та клініко-лабораторних обстежень, які проводилися в ДУ «Інститут спадкової патології НАМНУ» та Львівському медико-генетичному центрі, сформовано групу пацієнтів чоловічої статі з 30-ти осіб старше 20-ти років з клінічними ознаками, характерними для синдрому Кеннеді. Дані пробанди не підпадали під діагнози зі схожими симптомами до СБМА такими як: прогресуюча м'язова дистрофія Дюшенна/Беккера (ПМДБ) та спінальна м'язова атрофія (СМА). Більше того, ці діагнози були виключені молекулярно-генетично, оскільки всім пацієнтам провели дослідження поширених мутацій генів *SMN1* та *DMD*.

Продукти ампліфікації візуалізували шляхом проведення електрофорезу у 2 % агарозному гелі, який містив бромистий етидій, та сканували на ультрафіолетовому транслюмінаторі «ECX-15.M» (Vilber Lourmat). Результати сканування агарозних гелів знімали цифровою камерою «GelImager» (Helicon). Обробку зображень здійснювали на комп'ютері за допомогою програми Gel Explorer 2.0.

Основними клінічними проявами СБМА є слабкість у м'язах ніг, порушена хода, швидка втомлюваність, вставання «драбинкою», тремор, м'язові судоми, гінекомастія, дизартрія, дисфагія та порушена мова. Серед досліджуваних осіб у всіх спостерігалася швидка втомлюваність, слабкість у м'язах ніг та порушена хода. У 12 (40 %) дизартрія, у 8 (27 %) порушена мова, у 10 (33 %) тремор, у 4 (13 %) гінекомастія. Оскільки, одними з основних критеріїв оцінки стану м'язових волокон визнані біохімічні маркери такі як: креатинкіназа (СК), лактатдегідрогеназа (ЛДГ), аланін та аспартат трансферази (АлТ, АсТ) в сироватці крові, усім пацієнтам було призначено здати дані тести.

Таблиця 1. Послідовність праймерів для фланкування ділянки 1-го екзона гена *AR*

Назва	Послідовність
ARA(WALSH)F	5'ACCGAGGAGCTTTCCAGAAT3'
TAMRA-ARA(WALSH)R	5'CAGCTGAGTCATCCTCGTCCG3'

Показники концентрації даних ферментів були підвищені у більшості осіб досліджуваної групи: креатинкіназа СК у 26 (86 %), лактатдегідрогеназа ЛДГ у 16 (53 %), аланін трансфераза АлТ у 12 (40 %) та аспартат трансфераза АсТ у 13 (43 %). Важливе місце займає ензим креатинкіназа, оскільки його концентрація найвища в м'язовій тканині, та він практично відсутній в печінці та еритроцитах. Збільшення сироваткових ензимів, й зокрема СК, передусе появі клінічних проявів хвороби, що є важливим діагностичним критерієм. У 19 пробандів (73 %) рівень креатинкінази перевищував норму у 100-200 разів, що є достовірним маркером глибоких порушень у м'язах.

Важливими діагностичними критеріями СБМА є також показники електронейроміографії (ЕМГ). ЕМГ – це спосіб функціональної діагностики, що дозволяє виявити порушення в роботі м'язів і периферичних нервів. Завдяки проведенню ЕМГ верхніх і нижніх кінцівок можна діагностувати нервовом'язеві захворювання на ранніх стадіях, коли у пацієнта відсутні будь-які скарги або симптоми. Усі пацієнтів з досліджуваної групи мали проведену ЕМГ. У 27 (90 %) на ЕМГ детектувалися зміни по міопатичному типу. У 12 (40 %) пацієнтів виявлені ознаки аксональної мотонейронної полінейропатії кінцівок, що є одним з основних критеріїв СБМА.

Для підтвердження чи спростування діагнозу «синдром Кеннеді» чоловікам

проводили молекулярно-генетичне дослідження експансії тринуклеотидних повторів. У якості контролю, використовували контрольні зразки ДНК з відомою кількістю CAG- повторів у гені *AR*. Кількість повторів рахували за допомогою таблиці 2, у якій наведено вагу ампліфікованих фрагментів у співвідношенні до кількості CAG-повторів.

Експансію детектували за допомогою агарозного гелю (рис. 1). Доріжки 2, 3 – контрольні варіанти алелей з нормальною кількістю CAG-повторів (до 38 повторів), 4 – 49 повторів (синдром Кеннеді), 5 – контрольний зразок алель з 54-ма CAG-повторами. 6,7 – 23 CAG- повтори(варіант норми).

Проаналізовано 30 зразків ДНК на предмет виявлення експансії тринуклеотидних повторів гена *AR*. Серед обстеженої групи чоловіків у 9 спостерігався алель з 23 CAG-повторами, у 5-ти – з 30 CAG-повторами, у 8-ми спостерігався алель з 34 CAG-повторами. У 5-ти пробандів детектовано 38 повторів, що є верхньою межею норми. У дослідній групі чоловіків знайдено 3 випадки з 49 CAG-повторами, що засвідчило наявність синдрому Кеннеді (табл. 3).

Отже, в результаті молекулярно-генетичного аналізу серед пацієнтів з підозрою на синдром Кеннеді нами виявлено родинний випадок даного захворювання (рис. 2).

Таблиця 2. Співвідношення ваги фрагментів ДНК до кількості CAG-повторів

Мол. вага. п. н.	Кількість CAG-повторів	Мол. вага. п. н.	Кількість CAG-повторів	Мол. вага. п. н.	Кількість CAG-повторів	Мол. вага. п. н.	Кількість CAG-повторів	Мол. вага. п. н.	Кількість CAG-повторів
385	15	415	25	445	35	475	45	505	55
388	16	418	26	448	36	478	46	508	56
391	17	421	27	451	37	481	47	511	57
394	18	424	28	454	38	484	48	514	58
397	19	427	29	457	39	487	49	517	59
400	20	430	30	460	40	490	50	520	60
403	21	433	31	463	41	493	51	523	61
406	22	436	32	466	42	496	52	526	62
409	23	439	33	469	43	499	53	529	63
412	24	442	34	472	44	502	54	523	64

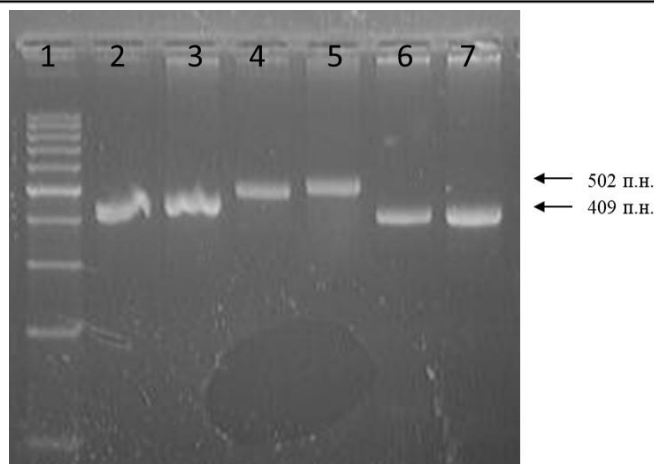


Рис. 1. Електрофореграма фрагмента ДНК, що містить тринуклеотидні повтори CAG гена *AR* (2 % агарозний гель). Доріжка 1 – маркери молекулярної ваги, 100 bp Ladder; 2, 3 – 23 CAG-повтори; 4 – 49 CAG-повтори; 5 - 54 CAG-повторів; 6, 7 – 23 CAG-повторів.

Таблиця 3. Кількість та частота CAG-повторів гена *AR* у чоловіків з підозрою на СБМА

Кількість CAG-повторів	Чоловіки з підозрою на СБМА, n=30	
	n	Частота, %
49	3	10,00
23	9	30,00
30	5	16,67
34	8	26,67
38	5	16,67

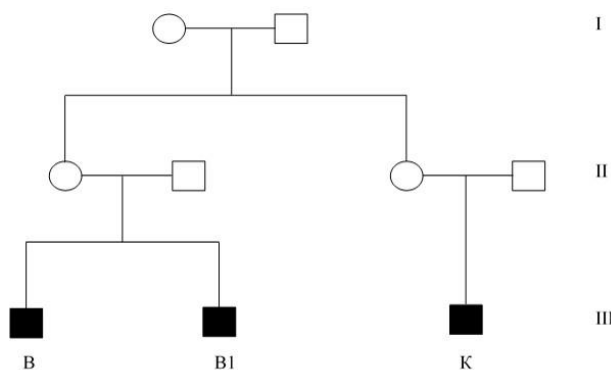


Рис. 2. Родовід родини з синдромом Кеннеді. В, В1, К – пробанди з підтвердженим Синдромом Кеннеді.

Двоє рідних братів мали різницю у віці в 5 років. У старшого брата (39 р. пробанд «В») лікар генетик спостерігав найважчі прояви СБМА (початок перших проявів з 31 р.). У пробанда «В» спостерігалася – порушена хода, слабкість у м'язах ніг, швидка втомлюваність, тремор, м'язові судороги, дизартрія, порушена мова. У двох інших братів «В1» та «К» (обоє віком 32 р.) спостерігалися тільки перші симптоми СБМА: слабкість у м'язах ніг, швидка втомлюваність.

Синдром Кеннеді – рідкісне Х-зчеплене рецесивне захворювання, що потребує розробки специфічних біомаркерів, для з'ясування пато-

генного процесу, та полегшення ранньої діагностики.

Висновки

1. Налагоджено та введено в перелік обстежень лабораторії генетичних досліджень методику аналізу експансії тринуклеотидних повторів *AR* гена андрогенового рецептора.

2. Проведено молекулярно-генетичне дослідження експансії тринуклеотидних повторів гена андрогенового рецептора *AR* у 30 осіб з підозрою на синдром Кеннеді. У 5 пробандів

досліджуваної групи встановлено 38 CAG-повторів (верхня межа норми)

новлено 49 CAG-повторів у гені *AR*, що засвідчило наявність синдрому Кеннеді.

3. Серед обстеженої групи пацієнтів знайдено родину, в якій у трьох чоловіків вста-

References

1. Liu X., Zhu M., Li X., Tang J. Clinical manifestations and AR gene mutations in Kennedy's disease. *Funct. Integr. Genomics*. 2019. Vol. 19. P. 533–539. doi: 10.1007/s10142-018-0651-7.
2. Breza M., Koutsis G. Kennedy's disease (spinal and bulbar muscular atrophy): a clinically oriented review of a rare disease. *J. Neurol.* 2019. Vol. 266. P. 565–573. doi: 10.1007/s00415-018-8968-7.
3. Grunseich C., Fischbeck K. H. Molecular pathogenesis of spinal bulbar muscular atrophy (Kennedy's disease) and avenues for treatment. *Curr. Opin. Neurol.* 2020. Vol. 33. P. 629–634. doi: 10.1097/WCO.0000000000000856.
4. Finsterer J., Soraru G. Onset Manifestations of Spinal and Bulbar Muscular Atrophy (Kennedy's Disease). *J. Mol. Neurosci.* 2016. Vol. 58. P. 321–329. doi: 10.1007/s12031-015-0663-x.
5. Pradat P. F., Bernard E., Corcia P. et al. The French national protocol for Kennedy's disease (SBMA): consensus diagnostic and management recommendations. *Orphanet. J. Rare Dis.* 2020. Vol. 15. P. 90–97. doi: 10.1186/s13023-020-01366-z.
6. Breza M., Koutsis G. Kennedy's disease (spinal and bulbar muscular atrophy): a clinically oriented review of a rare disease. *Journal of Neurology.* 2019. Vol. 266. P. 565–573. doi: 10.1007/s00415-018-8968-7.
7. Müller I., Nilssen O., Nebuchenykh M., Løseth S., Jonsrud C., Hoem G., Ghelue M. V., Arntzen K. A. Kennedy disease in two sisters with biallelic CAG expansions of the androgen receptor gene. *Neuromuscular Disorders.* Vol. 32. 2022. P. 75–79. doi: 10.1016/j.nmd.2021.11.007.
8. Arnold F. J., Merry D. E. Molecular Mechanisms and Therapeutics for SBMA/Kennedy's Disease. *Neurotherapeutics.* 2019. Vol. 16. P. 928–947. doi: 10.1007/s13311-019-00790-9.
9. Yong E. L., Loy C. J., Sim K. S. Androgen receptor gene and male infertility. *Human. Reproduction Update.* 2003. Vol. 9. P. 1–7. doi: 10.1093/humupd/dmg003.

TRETIK B. I., TYRKUS M. Ya., BAKUM Kh. Ya., ZASTAVNA D. V., AKOPYAN H. R.

State Institution «Institute of Hereditary Pathology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Ukraine, 79008, Lviv, M. Lysenko str., 31a

STUDY OF TRINUCLEOTIDE CAG-REPEATS EXPANSION IN ANDROGEN RECEPTOR GENE AMONG PATIENTS WITH SUSPECTED KENNEDY'S SYNDROME

Aim. To perform a molecular genetic study of CAG-repeat expansion in androgen receptor gene *AR* in individuals with suspected spinal and bulbar muscular atrophy (Kennedy's syndrome). **Methods.** Clinical and genealogical, method of differential diagnosis, DNA isolation and purification, molecular genetic: polymerase chain reaction, electrophoresis in agarose gel. **Results.** A molecular genetic study of trinucleotide CAG-repeats expansion in androgen receptor gene in 30 people with suspected Kennedy's syndrome was performed. In 5 probands of the study group, 38 CAG repeats (the upper limit of the norm) were established and in 27 examined patients, the number of CAG repeats did not exceed 37 (the norm). Among the examined group of patients, was found a family in which three men had 49 CAG repeats in the *AR* gene, which confirmed the presence of Kennedy's syndrome. **Conclusions.** Kennedy's syndrome is a rare X-linked recessive disease that requires the development of specific biomarkers to clarify the pathogenic process and facilitate early diagnosis.

Keywords: Kennedy's syndrome, *AR* androgen receptor gene, CAG trinucleotide repeats.