

Нугас булчингийн хатангирал өвчнийг нөхцөлдүүлэгч SMN1 генийн делеци мутацийг оношилсон үр дүн

Есүхэй Э.¹, Хандсүрэн Б.², Эрдэнэтуяа Д.², Болормаа Д.², Мандахнар М.², Оюунгэрэл Б.², Саранцэцэг Т.², Юндэндаш Д.¹, Ням-Эрдэнэ Н.¹, Батчимэг Б.¹, Алтансүх Ц.³, Мөнхбаяр С.¹, Чимэглхам Б.²

¹АШУУИС, Анагаах ухааны хүрээлэн, Эрдэм шинжилгээний төв лаборатори

²АШУУИС, Анагаах ухааны хүрээлэн, Мэдрэл судлалын сектор

³Анагаахын шинжлэх ухааны үндэсний их сургууль, БАС

e-mail: esukhei.ims@mnums.edu.mn

Abstract

A result of the detection of homozygous deletion of SMN1 gene in the spinal muscular atrophy

Esukhei E.¹, Khandsuren B.², Erdenetuya D.², Bolormaa D.², Mandakhnar M.², Oyungerel B.², Sarantsetseg T.², Yundendash D.¹, Nyam-Erdene N.¹, Batchimeg B.¹, Altansukh Ts.³, Munkhbayar S.¹, Chimeglkham B.²

¹Central Scientific Research Laboratory, Institute of Medical Sciences, MNUMS

²Department of Neurology, Institute of Medical Sciences, MNUMS

³School of Biomedicine, Mongolian National University of Medical Sciences

e-mail: esukhei.ims@mnums.edu.mn

Background

Spinal muscular atrophy (SMA) is a degenerative neuromuscular disease that causes progressive muscle weakness and atrophy due to the loss of the motor neurons. Approximately 95% of patients with SMA are homozygous for the deletion of SMN1 exon 7. With an incidence of 1/10.000 and a carrier frequency of 1/40 to 1/50, SMA is the most common genetic cause of death in infants.

Purpose

To detect homozygous deletion of SMN1 exon 7 and to analyse the SMN1 copy number by molecular-genetic analysis.

Materials and Methods

In this study, 3 SMA patients with SMN1 gene homozygous deletion and 17 people of their relatives were included. Molecular genetic analysis was performed in the Central Scientific Research Laboratory of the Institute of Medical Sciences. DNA was extracted from peripheral blood, and its purity was assessed by spectrophotometer. Homozygous deletion of SMN1 gene was analyzed with allele-specific PCR, and the SMN1 gene copy number was evaluated by real-time PCR.

Results

Among the five participants diagnosed with SMA by clinical symptom and electromyographic test, three cases were found to have homozygous deletion of exon 7 of the SMN1 gene, while two cases did not exhibit such mutation by the allele specific PCR analysis.

The mean age of study participants was 27.76 ± 16.07 (ranging from 8 months to 52 years).

Six of the 7 relatives of the first proband had 1 copy number of SMN1 (0.75 ± 0.29) or were carriers of SMA, while one had 3 copy numbers (2.99) or no deletion of SMN1 gene. Additionally, 6 of the 7 individuals of the second proband had 1 copy number of the SMN1 gene (0.72 ± 0.14), and 1 person had 2 copy numbers. All 3 relatives of the third proband had 1 copy number of SMN1 gene (0.96 ± 0.37).

Conclusion: We consider that determination of SMN1 gene homozygous deletion and carrier testing can be performed by the PCR method locally. Further, it is necessary to implement the molecular-genetic testing method into practice and to study the requirements and needs of early detection of SMA in the newborn screening program of Mongolia.

Key words: SMN1 gene copy number, carrier testing, genetic counselling, real-time PCR, child disability.

Pp. 20-29, Table 1, Figures 10, References 22

Үндэслэл

Нугас булчингийн хатангирал (НБХ) өвчин аутосомын рецессив хэлбэрээр удамшин, доод мотор нейроны алдагдлаар илэрдэг давшингүй явцтай булчингийн сулрал, хатангирал үүсгэдэг эмгэг юм. НБХ өвчний тархалт 100,000 хүн амд 1-2 тохиолдол, өвчлөл ойролцоогоор 10,000 амьд төрөлтөд 1 байдаг [1] ба нийт хүн амд 40-50 хүний 1 нь тээгч байдаг [2]. НБХ нь нярай хүүхдийн эндэгдлийн тэргүүлэх генетикийн шалтгаант өвчинд тооцогддог байна [3].

НБХ-тай өвчтөнд SMN (survival motor neuron) уургийг кодолдог SMN1 генийн хоёр аллель делецид орсны улмаас үйл ажиллагаа явуулах боломжгүй SMN уураг нийлэгжсэнээс үүдэн доод мотор нейрон сөнөрөлд өртдөг. Уг өвчний үед SMN1 генийн 7-р экзону гомозигот делеци өвчтөнүүдийн 95%-д дэд хэвээс үл хамааран илэрдэг ба үлдсэн хэсэг нь SMN1 генийн цэгэн гэх мэт бусад мутацитай холбоотой байдаг. НБХ-тай өвчтөнүүд хамгийн багадаа SMN2 генийн нэг хуулбарыг агуулдаг [2]. НБХ өвчний явц, хүндийн зэрэг голчлон SMN2 генээр зохицуулагдах ба өвчтөнд SMN2-ийн хуулбарын тоо их байх тусам фенотип нь хөнгөн байдаг [4].

НБХ өвчний генетикийн оношилгоонд multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), өндөр мэдрэмжит шингэний хроматографи (DHPLC) болон бодит хугацааны полимеразын гинжин урвал (БХПГУ), эсгэгээр таслах ПГУ (PCR-RFLP)-ын аргуудыг түлхүү ашигладаг [5]. Мөн дараалал тогтоох шинжилгээ (next generation sequencing)-ний аргаар НБХ өвчний

тээгчийг илрүүлэх боломжтой [6,7]. Хөгжиж буй орнуудад эсгэгээр таслах ПГУ, MLPA, БХПГУ-ын аргуудыг ашигладаг ч эмнэлгийн лабораториудад тоног төхөөрөмж хангалтгүй байгаагаас шалтгаалан шинжилгээ хийхэд хүндрэл үүсдэг.

ПГУ-ын нөхцлийг өөрчлөн ашиглаж буй өөр нэгэн төрөл нь аллельд өвөрмөц ПГУ бөгөөд энэхүү аргаар нэг нуклеотидын өөрчлөлтийг ялган таних боломжтой [8]. Аллельд өвөрмөц ПГУ-ын аргаар НБХ өвчнийг илрүүлэх генетик оношилгоог 1999 оны эхэн үед тодорхойлсон байдаг [2,9-13]. Дээр дурдсанчлан, НБХ өвчний үед SMN1 генийн 7-р экзонгүй байдаг тул аллельд өвөрмөц ПГУ болон таслагдсан фрагментийн уртаар олон хэлбэршилтийг тогтоох ПГУ-ын хоёр аргаар SMN1 генийн 7-р экзону гомозигот делецийг илрүүлэх энгийн бөгөөд хурдан шинжилгээний аргыг бий болгосон [13].

НБХ өвчнийг оношилсноор удамзүйн зөвлөгөө өгөх, өвчний өвөрмөц эмчилгээг зөвлөхөд маш чухал юм. Сүүлийн жилүүдэд НБХ өвчний шинэ эм, эмчилгээнүүд гарч ирсэн нь оношилгоог аль болох эрт эхэлж, эрт үед эмчилгээг эхлэх нь үр дүнтэй байгаа талаар тэмдэглэжээ [19-20].

Манай орны хувьд НБХ өвчнийг Улаанбаатар хотын хүн амын дунд судалсан Д.Баасанжав нар (2000)-ын судалгаагаар 100,000 хүн амд 0.5 давтамжтай, энэ өвчний 4 дэд хэв байгааг тэмдэглэсэн. НБХ өвчний молекул-генетикийн шинжилгээг Монголд хараахан хийгээгүй байна.

Зорилго

Нугас булчингийн хатангирал өвчний SMN1 генийн делеци мутаци, тоон хуулбарыг молекул-генетикийн шинжилгээний аргаар тогтоох

Материал, аргазүй

Т.Шагдарсүрэнгийн нэрэмжит Анагаах ухааны хүрээлэнгийн Мэдрэл судлалын сектор, Эрдэм шинжилгээний төв лаборатори (ЭШТЛ)-ийн судлаачид Анагаах ухааны хүрээлэнгийн Эрдмийн зөвлөл (2023.7.06, №05 тогтоол), ЭМЯ-ны дэргэдэх АУ-ны Ёсзүйн хяналтын хорооны хурлаар судалгааны аргазүйг хянан хэлэлцүүлж, судалгаа явуулах зөвшөөрлийг авсны (2023.11.13, №23/060) дагуу хийж гүйцэтгэв. НБХ өвчний сэжигтэй буюу олон улсын өвчний 10-р ангиллаар G12.0, G12.1, G12.8, G12.9, G70 кодтой хүмүүсийг УБ хотын дүүргийн эмнэлгүүд, 21 аймгийн эрүүл мэндийн газар, Хөдөлмөр халамжийн үйлчилгээний

ерөнхий газарт албан бичгээр хандан нийт 182 хүний мэдээлэл өгсний дагуу АУХ-ийн Мэдрэл судлалын секторын мэдрэлийн эмч, судлаачид 167 хүнтэй холбоо барьж, 51 хүнд мэдрэлийн нарийн үзлэг хийж, НБХ өвчний магадлалтай тохиолдлыг молекул-биологийн шинжилгээнд хамруулж ажилласан. Мэдрэлийн эмчийн нарийн үзлэг болон булчингийн цахилгаан бичлэгийн үр дүнд өвчний магадлалтай 5 тохиолдол, тэдний цусан төрлийн 17 хүнийг хамруулж, молекул-генетикийн шинжилгээг АУХ-ийн Эрдэм шинжилгээний төв лабораторид хийж гүйцэтгэв.

ДНХ ялгах, гарцыг үнэлэх

Молекул генетикийн шинжилгээнд судалгаанд оролцогчдын захын венийн судаснаас 3 мл цусны дээжийг EDTA бүхий вакуум хуруу шилэнд авч, “Qiagen Blood mini kit” цомог

ашиглан ДНХ-ийг цэврээр ялган, цэвэршилтийг спектрофотометрээр үнэлэв. Дээжүүдээс ялгасан геномын ДНХ-ийн концентрацийг 20 нг/мкл байхаар шингэлж -20°C-д хадгалсан.

SMN1 генийн гомозигот экзон 7 делеци илрүүлэх аллельд өвөрмөц ПГУ

Ялган авсан ДНХ-ийг TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version ПГУ-ын цомог (TaKaRa, Otsu, Japan), SMN1 генийн гомозигот делецийг илрүүлэх Feldkuttler нарын судалгаандаа ашигласан хос праймер SMN1-F 5'-TTTATTTTCCTTACAGGGTTTC-3' болон SMN1-R 5'-GTGAAAGTATGTTTCTTCCACgTA-3', хяналтын генээр (β-globin)-F 5'-ACCTCACCTGTGGAGCCAC-3', R 5'-CTCACCACCAACTTCATCCAAG-3' хос праймер ашиглан протоколын дагуу аллельд өвөрмөц ПГУ явуулж генийг олшруулав. Үүссэн бүтээгдэхүүнийг 2%-ийн агароз гелиэр гүйлгэж UV гэрлийн тусламжтайгаар үр дүнг үнэлэв. SMN1 ген 307 х.н, β-globin ген 240 х.н урттай бүтээгдэхүүнүүд тус тус үүснэ.

Бодит хугацааны ПГУ болон SMN1 генийн тоон хуулбар

SMN1 генийн тоон хуулбарыг CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, California, USA) баражийн тусламжтай аллельд өвөрмөц ПГУ-д ашигласан хос праймерийг ашиглав. Хяналтын ген олшруулах ПГУ-ын урвалж 20 мкл-ээс тогтох ба 40 нг ДНХ, 900 нМ β-глобин генийн шууд болон урвуу праймер, 1X SYBR GREEN мастер микс (Zanaspex, Mongolia), бай генийг олшруулах ПГУ-ын урвалж 20 мкл-ээс тогтох ба 40 нг ДНХ, 900 нМ SMN1 генийн шууд болон урвуу праймер, 1X SYBR GREEN мастер миксийг тус тус агуулахаар тохируулав.

БХПГУ-ын нөхцлийг 95°C-д 10 минут, 35 циклээр 95°C-д 1 минут, 60°C-д 2 минут байхаар тохируулж дотоод хяналтын дээжээр НБХ өвчин оношилогдоогүй эрүүл хүний ДНХ-ийг ашиглав.

Нэг дээжид гурван удаагийн (трипликаци) туршилт явуулсан ба утгуудын дунджийг тооцон гаргав.

Үр дүнг олон улсад ашигладаг доорх томьёоллын дагуу тооцоолол хийж генийн тоон хуулбарыг тогтоов;

1. Дээжүүдийн ΔCt утгыг тооцож олно. $\Delta Ct = Ct$ (генийн хуулбар тодорхой бус дээж) – Ct (хяналтын ген)
2. Дараа нь $\Delta\Delta Ct$ утгыг олно. $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (генийн хуулбар тодорхой бус дээж) - ΔCt (хяналтын ген)
3. RQ (relative quantity) утгыг олно. $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$
4. Гарсан хариуг ашигласан хяналтын генийн хувилбарын тоогоор үржүүлнэ (2 хуулбартай бол 2-оор үржүүлэх г.м). $2 \times RQ$

Үр дүн

Бидний судалгаанд эмнэлзүй ба электромиографийн шинжилгээгээр НБХ өвчин оношилогдсон 5 тохиолдол ба тэдгээрийн цусан төрлийн 17, нийт 22 оролцогч хамрагдав. Судалгаанд оролцогчдын дундаж нас

27.76±16.07 (8 сараас 52 нас бүхий эрэгтэй 14, эмэгтэй 8) байсан.

Эмнэлзүй, молекул-генетикийн шинжилгээгээр НБХ өвчин батлагдсан 3 тохиолдлын эмнэлзүйн шинжийн талаар Хүснэгт 1-д тоймлон харуулав.

Table 1. Clinical signs of spinal muscular atrophy cases

	Symptoms	Case 01A	Case 03A	Case 05A
1.	Age	37	3	23
2.	Sex	male	female	male
3.	Disease onset	6-7 years old	11-month-old	1 years old
4.	Are there any relatives with similar symptoms?	no	no	no
5.	Head and neck muscle strength	5	3	3
6.	Proximal muscle strength of upper extremities	3	2	2
7.	Distal muscle strength of upper extremities	4	4	3
8.	Proximal muscle strength of lower extremities	1	0	0
9.	Distal muscle strength of lower extremities	1	1	1

	Symptoms	Case 01A	Case 03A	Case 05A
10.	Brachio-radialis reflex	0	0	0
11.	Biceps reflex	0	0	0
12.	Triceps reflex	0	0	0
13.	Patellar reflex	0	0	0
14.	Achilles reflex	0	0	0
15.	EMG: Chronic neurogenic pattern	+	+	+
16.	Scoliosis	+	+	+
17.	Contracture	-	+/knee, ankle/	-
18.	Gynecomastia	-	-	+
19.	ALS- FRS	30		25
20.	CHOP-INTEND		38	

Судалгааны молекул-генетикийн шинжилгээ 2 алхмаас бүрдсэн. НБХ өвчинтэй гэж эмнэлзүйгээр оношлогдсон өвчтөнүүдэд SMN1 генийн 7-р экзоны гомозигот делецийг

илрүүлэх, цаашид гомозигот делеци илэрсэн өвчтөнүүдийн цусан төрлийн хүмүүст SMN1 генийн тоон хуулбарыг тодорхойлох буюу энэ өвчний тээгчийг илрүүлэв.

1. Аллель Өвөрмөц ПГУ-ын аргаар SMN1 генийн делецийг илрүүлсэн дүн

SMN1 генийн 7-р экзоны гомозигот делецийг аллель өвөрмөц ПГУ-ын шинжилгээгээр тодорхойлоход 1, 3 болон 5 дугаартай өвчтөнд

SMN1 генийн 7-р экзоны гомозигот делеци илрэв (Зураг 1).

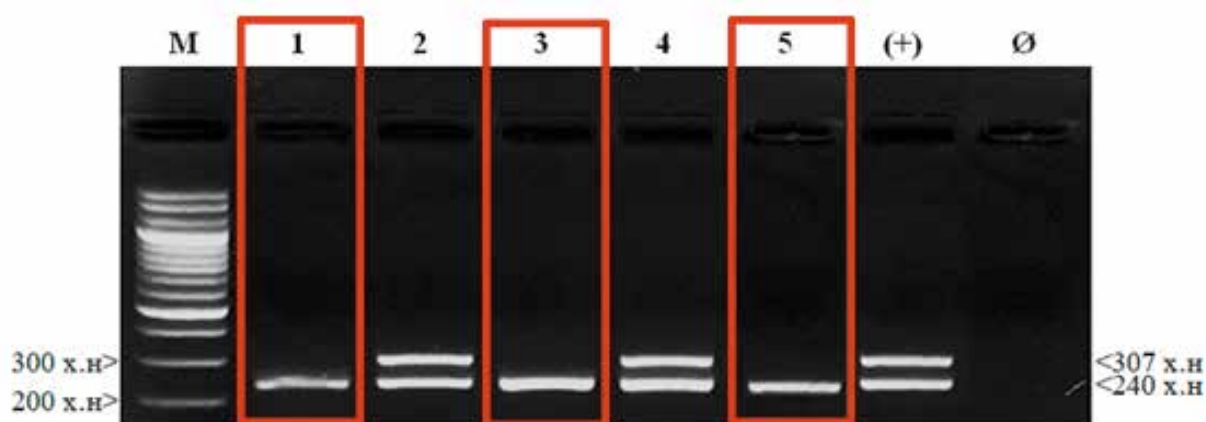


Figure 1. Allele specific amplification of exon 7 for SMN1 gene 307 b.p-SMN1 gene amplification, 240 b.p-control gene (β -globin) amplification. "M"-molecular marker, "1,2,3,4,5": samples of SMA patients who were diagnosed with clinical sign and EMG testing, "+"-positive control, "Ø"-negative control.

Улмаар делеци илэрсэн 3 пробандын цусан төрлийн нийт 17 оролцогчдыг хамруулж, молекул-генетикийн шинжилгээ хийв.

SMN1 генийн 7-р экзоны гомозигот делеци илэрсэн 1-р пробанд (SMA01A)-ын цусан төрлийн 7 хүнд хийсэн ПГУ-ын шинжилгээний үр дүнг дор (Зураг 2) харуулав.



Figure 2. Allele specific amplification of exon 7 for SMN1 gene in relatives of proband 1 (SMA-01A) 307 b.p-SMN1 gene amplification, 240 b.p-control gene (β -globin) amplification. "M"-molecular marker, "A": proband 1, "B-E": children of the proband, "F-H": cousins of the proband, "+"-positive control, "Ø"-negative control.

Аллель өвөрмөц ПГУ-ын бүтээгдэхүүнд электрофорез хийж үр дүнг үнэлэхэд 1-р пробандын цусан төрлийн хүмүүст (B-H дугаартай сорьцонд) SMN1 генийн 7-р экзоны гомозигот делеци илрээгүй.

2-р пробанд (SMA03A)-ын цусан төрлийн 7 хүнд хийсэн ПГУ-ын шинжилгээний үр дүнг харуулав (Зураг 3).

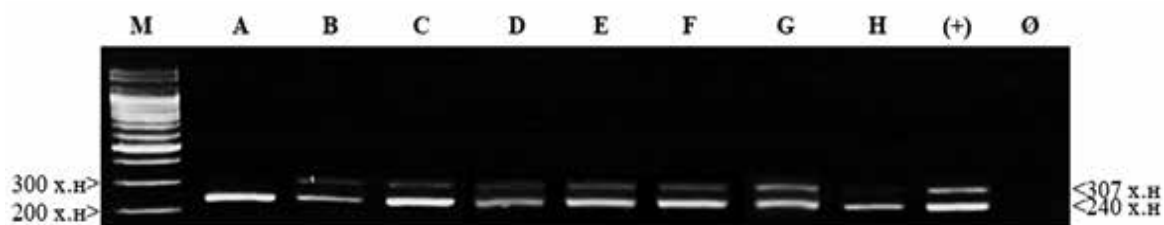


Figure 3. Allele specific amplification of exon 7 for SMN1 gene in relatives of proband 2 (SMA-03A) 307 b.p-SMN1 gene amplification, 240 b.p-control gene (β -globin) amplification. "M"-molecular marker, "A": proband 2, "B": mother of the proband, "C": father of the proband, "D-H": relatives of the proband, "+"-positive control, "Ø"-negative control.

Аллель өвөрмөц ПГУ-ын бүтээгдэхүүнд электрофорез хийж үр дүнг үнэлэхэд 2-р пробандын цусан төрлийн хүмүүс буюу B-H дугаартай сорьцонд SMN1 генийн 7-р экзоны гомозигот делеци илрээгүй.

3-р пробанд (SMA05A)-ын цусан төрлийн 3 хүнд хийсэн ПГУ-ын шинжилгээний үр дүнг дор харуулав (Зураг 4).

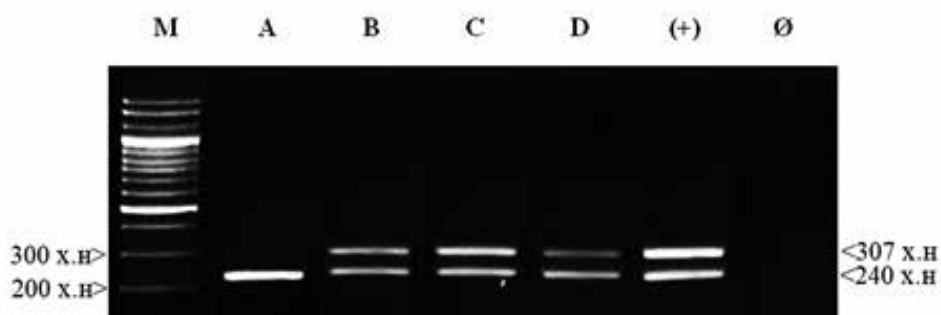


Figure 4. Allele specific amplification of exon 7 for SMN1 gene in relatives of proband 3 (SMA-05A) 307 b.p-SMN1 gene amplification, 240 b.p-control gene (β -globin) amplification. "M"-molecular markers, "A": proband 3, "B": mother of the proband, "C": father of the proband, "D": sibling of the proband, "+"-positive control, "Ø"-negative control.

Аллель өвөрмөц ПГУ-ын бүтээгдэхүүнд электрофорез хийж үр дүнг үнэлэхэд 3-р пробандын цусан төрлийн B-D дугаартай сорьцонд SMN1 генийн 7-р экзоны гомозигот делеци илрээгүй.

Судалгаанд оролцсон 3 пробандын цусан төрлийн оролцогчдын хувьд гомозигот делеци илрээгүй боловч тус генийн удамшлын хэлбэрээс шалтгаалан генотипийн хувьд гетерозигот буюу НБХ өвчний тээгч байх магадлалтай байна.

2. Бодит Хугацааны ПГУ-ын аргаар SMN1 генийн генотипийг тодорхойлсон дүн

Бид Аллель өвөрмөц ПГУ-ын аргаар SMN1 генийн 7-р экзоны гомозигот делеци илэрсэн 3 пробанд болон тэдний цусан төрлийн 17 нийт 20 хүнд SMN1 генийн генотипийг бодит хугацааны ПГУ-аар тодорхойход SMN1 генийн 2 тоон хуулбартай (дундаж 2.48 ± 0.46) 3 хүн, 1 тоон хуулбартай (дундаж 0.76 ± 0.24) 15 хүн байлаа.

Судалгааны 1-р пробандын цусан төрлийн хүмүүсийн 7 хүнээс 6 нь SMN1 генийн 1 тоон хуулбартай (0.75 ± 0.29) буюу НБХ тээгч байсан бол 1 тохиолдол 3 (2.99) тоон хуулбартай буюу SMN1 генийн делецигүй байв (Зураг 5).

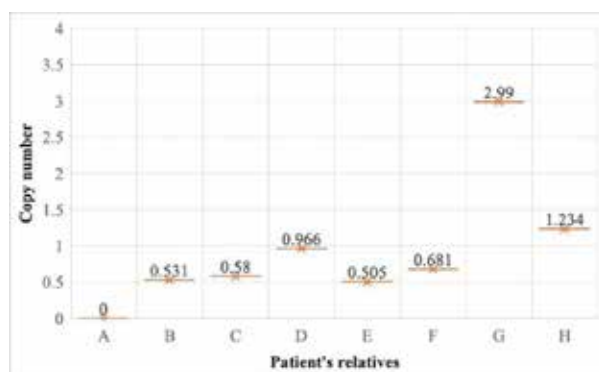


Figure 5. SMN1 gene copy number values in relatives of proband 1 (SMA-01A) (Box-and-whisker plot) "A": proband 1 (SMA-01A), "B-E": children of the proband, "F-H": cousins of the proband.

Мөн аллель өвөрмөц ПГУ болон бодит хугацааны ПГУ-ын шинжилгээнд үндэслэн удмын зургийг гаргав (Зураг 6).

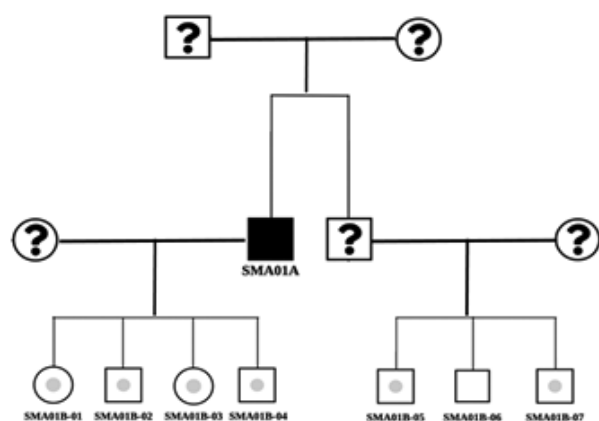


Figure 6. Family pedigree of proband 1 (SMA-01A) with confirmed SMA Note: Question marks indicate family members who were not included in the analysis.

SMN1 генийн 7-р экзоны гомозигот делецитэй 2-р пробанд (SMA-03A)-ын цусан төрлийн 7 хүний 6 нь НБХ өвчний тээгч буюу SMN1 генийн

1 тоон хуулбартай (0.72 ± 0.14) байсан бол 1 хүн нь 2 тоон хуулбартай байв (Зураг 7).

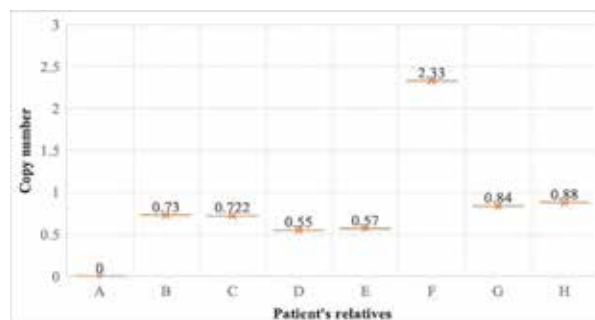


Figure 7. SMN1 gene copy number values in relatives of proband 2 (SMA-03A) (Box-and-whisker plot) "A": proband 2 (SMA-03A), "B-H": relatives of the proband

Аллель өвөрмөц ПГУ болон бодит хугацааны ПГУ-ын шинжилгээнд үндэслэн удмын зургийг гаргав (Зураг 8).

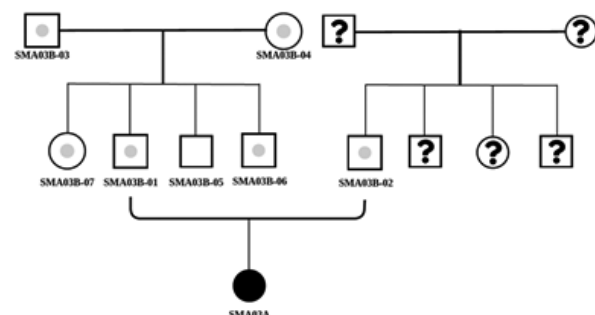


Figure 8. Family pedigree of proband 2 (SMA-03A) with confirmed SMA

SMN1 генийн 7-р экзоны гомозигот делецитэй 5-р пробанд (SMA-05A)-ын цусан төрлийн 3 хүн SMN1 генийн 1 тоон хуулбартай (0.96 ± 0.37) байсан нь бүгд өвчний тээгч болохыг харууллаа (Зураг 9).

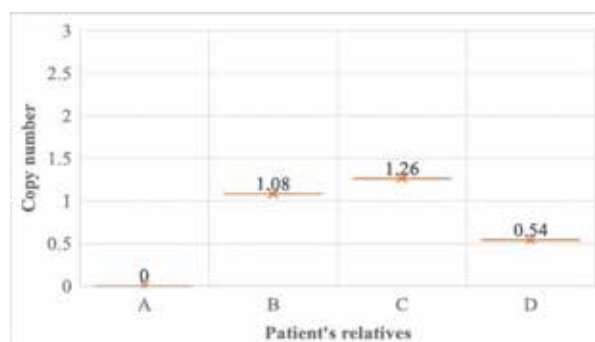


Figure 9. SMN1 gene copy number values in relatives of proband 3 (SMA-05A) (Box-and-whisker plot) "A": proband 3 (SMA-05A), "B": mother of the proband, "C": father of the proband and "D": sibling of the proband

Аллель өвөрмөц ПГУ болон бодит хугацааны ПГУ-ын шинжилгээнд үндэслэн удмын зургийг гаргав (Зураг 10).

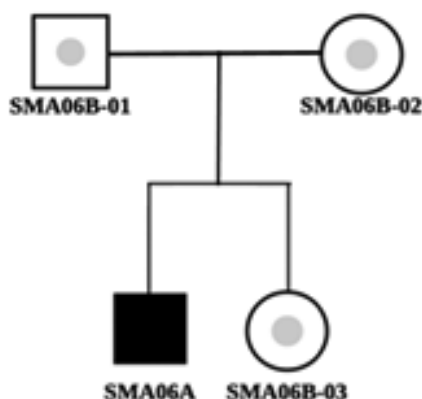


Figure 10. Family pedigree of proband 3 (SMA-05A) with confirmed SMA

Хэлцэмж

Бид энэ судалгаанд эмнэлзүйн үзлэг болон булчингийн цахилгаан бичлэгийн шинжилгээгээр НБХ өвчний магадлалтай 5 тохиолдолд аллель өвөрмөц ПГУ шинжилгээ хийж, түүнээс эерэг үр дүн гарсан 3 пробандын цусан төрлийн гэр бүлийн 17, нийт 22 хүнийг хамруулж молекул-генетикийн шинжилгээг хийв. Молекул генетикийн шинжилгээг 2 алхмаар хийсэн. Үүнд, НБХ-тай гэж эмнэлзүйгээр оношлогдсон өвчтөнүүдэд SMN1 генийн 7-р экзоны гомозигот делецийг илрүүлэх шалгах, цаашид гомозигот делеци илэрсэн тохиолдлын цусан төрлийн хүмүүст SMN1 генийн тоон хуулбарыг бодит хугацааны ПГУ-ын арга ашиглаж тодорхойлох буюу энэхүү өвчний тээгчийг тодорхойлох юм.

SMN1 генийн 7-р экзоны гомозигот делеци илэрсэн 1-р пробандын цусан төрлийн 7, 2-р пробандын цусан төрлийн 7, 3-р пробандын цусан төрлийн 3 оролцогчдын хувьд гомозигот делеци илрээгүй боловч тус генийн удамшлын хэлбэрээс шалтгаалан генотипийн хувьд гетерозигот байх боломжтой юм. Тиймээс бид SMN1 генийн гомозигот делеци илэрсэн өвчтөнүүдийн цусан төрлийн хүмүүст бодит хугацааны ПГУ-ын шинжилгээгээр тухайн генийн тоон хуулбарыг тодорхойлон үнэлэхэд 1-р пробандын цусан төрлийн нийт 7 хүнээс 6, 2-р пробандын цусан төрлийн 7 хүнээс 6, 3-р пробандын цусан төрлийн 3 хүн нийт 15 оролцогчид SMN1 генийн 1 тоон хуулбартай буюу өвчний тээгч болохыг шинжилгээгээр баталгаажуулав. Судалгаагаар генийн гомозигот делеци илэрсэн өвчтөнүүдийн хүүхдүүд болон эцэг эх нь таамаглалын дагуу өвчний тээгч эсвэл генийн гомозигот делецитэй байх боломжтой гэж үзэж байв. Бодит хугацааны

ПГУ-ын шинжилгээгээр гарсан хариу нь энэхүү таамагтай таарсан бөгөөд гомозигот делеци илэрсэн өвчтөнүүдийн хүүхдүүд болон эцэг эх нь тус генийн 1 тоон хуулбартай буюу өвчний тээгч болох нь батлагдав.

Сүүлийн 10 жилд НБХ өвчнийг оношлох олон төрлийн аргууд бий болсон. Үүнд эсгэгээр таслах ПГУ (PCR-RFLP), бодит хугацааны ПГУ (quantitative polymerase chain reaction (qPCR)), фермент холбоот эсрэг биеийн урвал (ELISA), мультитплекс полимеразын гинжин урвал (ПГУ)-ын шинжилгээний нэг төрөл multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), өндөр мэдрэмжит шингэний хроматографи (DHPLC) зэрэг бусад нэг нуклеотидын полиморфизмоос шалтгаалсан өвчнийг илрүүлэх шинжилгээний аргууд багтана. Хөгжиж буй орнуудад эсгэгээр таслах ПГУ, multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) болон бодит хугацааны ПГУ-ын аргуудыг ашигладаг ч эмнэлгийн лабораториудад тоног төхөөрөмж хангалтгүй байгаагаас шалтгаалан шинжилгээ хийхэд хүндрэл үүсдэг [16].

Аллель өвөрмөц ПГУ-ын аргаар НБХ өвчнийг оношлох аргыг анх 1999 оны үед тайлбарласан байдаг [9-10]. Аллель өвөрмөц ПГУ-ын аргад ашиглаж байгаа ДНХ-ийн хэмжээнээс хамаарч үр дүнд өөрчлөлт орох зэрэг асуудал тулгардаг. SMN1 генийн делецийг илрүүлэх чанарт суурилсан НБХ өвчний оношилгооны мэдрэг чанарт SMN2 ген сөрөг нөлөө үзүүлэх эрсдэлтэй байдаг. Учир нь SMN2 ген SMN1 гентэй 99.8% ижил байдаг тул шинжилгээгээр SMN1 генийг ПГУ-аар олшруулах үед SMN2 ген нь давхар олшрон үр дүнд сөргөөр нөлөө үзүүлэх боломжтой [14]. Бид судалгаандаа

Feldkutter нарын зохиосон праймерыг ашигласан ба энэхүү праймерын мэдрэг чанар нь 95.2% байсан [2] төдийгүй ашиглаж буй ДНХ-ийн хэмжээ өндөр байхаас үл хамааран SMN1 генийг сонгомлоор олшруулж байсан үр дүнг судалгаануудад дурдсан байв [14]. Feldkutter нарын судалгаанд 140 хүнээс 3 хүн нь SMN1 генийн 3 тоон хуулбартай гэж илэрсэн бол бидний судалгаанд 1-р пробандын гэр бүлийн нэг хүн нь SMN1 генийн 3 тоон хуулбартай үр дүн гарав. Бусад судалгаагаар SMN1 генийн гетерозигот илрэх давтамж 1/30-аас 1/50 байсан ч [17] бидний судалгаанд хамрагдсан хүмүүсийн тоо цөөн байсны улмаас популяцид илрэх SMN1 генийн тоон хуулбарыг бусад судалгаатай харьцуулах боломжгүй байв. Эмнэлзүй болон электромиографийн шинжилгээгээр НБХ өвчний магадлалтай гэж оношлогдсон боловч SMN1 генийн 7-р экзоны делеци илрээгүй тохиолдлын хувьд НБХ өвчнийг шууд үгүйсгэх боломжгүй ба өөрөөр хэлбэл НБХ өвчний 3.4%-д өөр төрлийн мутаци буюу цэгэн мутаци үүссэн байх боломжтой талаар судалгаанд дурдсан байна [15, 18]. Тухайн хүмүүсд оношийг баталгаажуулахын тулд цаашид SMN1 генийн дараалал тогтоох шинжилгээг хийх хэрэгтэй. Манай орны хувьд энэ шинжилгээг хийхэд тоног төхөөрөмж хангалтгүй байгаа нь хүндрэл үүсгэж байна.

Аллель өвөрмөц ПГУ-аар зөвхөн SMN1 генийн бүтээгдэхүүн үүсэх ба гомозигот делецитэй үед бүтээгдэхүүн үүсэхгүй буюу нэг урвалаар үр дүн гарах тул эсгэгээр тасдах шат шаардагдахгүй юм. Аллель өвөрмөц ПГУ-ын аргаар SMN1 генийн 7-р экзоны гомозигот делецийг илрүүлэх нь эсгэгээр таслах аргаас 5 дахин илүү хурдан, 68%-аар илүү бага өртөгтэй байсныг судалгаагаар харуулсан [14]. Мөн энэхүү арга нь цөөн шат дамжлагатай тул судалгааны үед алдаа гарах эрсдэлийг багасгах юм [14]. Тиймээс бидний ашигласан шинжилгээний арга зүйг НБХ өвчнийг оношлох оношилгоонд ашиглах боломжтой юм гэдгийг судалгаагаар харууллаа. Мөн аллель өвөрмөц ПГУ-ын үр дүнд үүссэн бүтээгдэхүүний үзүүлэх гэрлийн

Дүгнэлт

Аллель өвөрмөц ПГУ-ын шинжилгээгээр нугас булчингийн хатангирал өвчний үндсэн шалтгаан болох SMN1 генийн 7-р экзоны гомозигот делецийг илрүүлэх, бодит хугацааны ПГУ-ын шинжилгээгээр тус генийн тоон хуулбарыг

эрчмийг хяналтын генийн эрчимтэй харьцуулан жишсэнээр генийн гетерозигот буюу 1 тоон хуулбартай эсэхийг тодорхойлох боломжтой гэж Mehmet нарын судалгаанд дурдсан байв [11]. Бидний судалгаанд гетерозигот байх боломжтой дээжүүдийн бүтээгдэхүүн хяналтын гентэй харьцуулахад өнгөний эрчим султай байсан нь Mehmet нарын судалгаатай зарим талаар нийцэж байгаа юм.

Бидний ашигласан аллель өвөрмөц ПГУ-ын аргаар лабораторийн нарийн тоног төхөөрөмж болон урвалж бодис шаардагдахгүйгээр бага өртгөөр, хурдан хугацаанд НБХ өвчнийг үнэн зөв оношлох боломжтой гэдгийг судалгаагаар харуулав. Бид бодит хугацааны ПГУ-ын шинжилгээгээр судалгаанд оролцогчдын генотипийг тодорхойлсон бөгөөд удмын зураглал гаргах, цаашлаад удамзүйн зөвлөгөө өгөх боломжтойг харуулав.

НБХ өвчний генийн эмчилгээ гэх мэт үр дүнтэй эмчилгээ сүүлийн үед гарч ирсээр байгаа ч эмчилгээний үр дүн нь оношилгоо болон эмчилгээ хоорондын хугацаанаас хамаардаг байна [19]. Мотор нейрон их хэмжээгээр алдагдсан тохиолдолд эмчилгээгээр засах боломжгүй гэдгийг мэдэгдсэн [20]. Тиймээс НБХ өвчний эмчилгээг үр дүнтэй байлгахын тулд эмчилгээг өвчний шинж тэмдэг илрэхээс өмнө эхлэх хэрэгтэй [19]. Эрт үеийн оношилгоогоор жил бүр 50 нярайг амьсгалын аппарат хэрэглэхээс сэргийлэх, НБХ 1-р дэд хэвтэй ойролцоогоор 30 нярайг нас барахаас сэргийлэх боломжтой гэж судалгаанд дурдсан байв [21].

SMN1 генийн делецийг тогтоохоос гадна цаашид SMN2 генийн оношилгоог хийх шаардлагатай. Учир нь SMN2 ген нь НБХ өвчний хүндрэлийн зэрэгт нөлөөлдөг [22]. SMN2 генийн тоон хуулбар олон байх тусам өвчний шинж тэмдэг хөнгөн байдаг бол эсрэгээрээ тоон хуулбар бага байх тохиолдолд өвчний зэрэг хүндэрдэгийг судалгаагаар харуулсан [14]. Тиймээс SMN2 генийн тоон хуулбарыг тодорхойлох нь өвчний хүндрэлийн зэргийг тогтоох, цаашлаад тохирсон эмчилгээг эхлүүлэхэд чухал юм.

тодорхойлж, оношийг бүрэн баталгаажуулах боломжтой гэж үзэж байна.

Цаашид энэхүү аргыг практикт нэвтрүүлэх, нярайн скрининг хөтөлбөрт оруулах шаардлага, хэрэгцээг судлах хэрэгтэй байна.

Талархал

Энэхүү судалгааг гүйцэтгэхэд туслалцаа үзүүлсэн Хөдөлмөр халамжийн үйлчилгээний ерөнхий газар, Монгол улсын 21 аймгийн Эрүүл мэндийн газар, УБ хотын дүүргийн ЭМТ,

АШУУИС-ийн Монгол-Японы эмнэлэг, Рефлекс эмнэлгийн удирдлага, мэдрэлийн эмч нарт гүн талархал илэрхийлье.

Ном зүй

- Verhaart, I.E.C.; Robertson, A.; Wilson, I.J.; Aartsma-Rus, A.; Cameron, S.; Jones, C.C.; Cook, S.F.; Lochmüller, H. Prevalence, Incidence and Carrier Frequency of 5q-Linked Spinal Muscular Atrophy-A Literature Review. *Orphanet J. Rare Dis.* 2017, 12, 124.
- Feldküttler M, Schwarzer V, Wirth R, Wienker TF, Wirth B. Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet.* 2002 Feb;70(2):358-68. doi: 10.1086/338627. Epub 2001 Dec 21. PMID: 11791208; PMCID: PMC419987.
- Lunn, M.R.; Wang, C.H. Spinal Muscular Atrophy. *Lancet* 2008, 371, 2120–2133. [CrossRef] [PubMed]
- Prior, T. W., Nagan, N., Sugarman, E. A., Batish, S. D., & Braastad, C. (2011). Technical standards and guidelines for spinal muscular atrophy testing. *Genetics in Medicine*, 13(7), 686-694.
- Wang KC, Fang CY, Chang CC, Chiang CK, Chen YW. A rapid molecular diagnostic method for spinal muscular atrophy. *J Neurogenet.* 2021 Mar;35(1):29-32. doi: 10.1080/01677063.2020.1853721. Epub 2020 Dec 17. PMID: 33332175.
- Larson, J.L., Silver, A.J., Chan, D. et al. Validation of a high resolution NGS method for detecting spinal muscular atrophy carriers among phase 3 participants in the 1000 Genomes Project. *BMC Med Genet* 16, 100 (2015). <https://doi.org/10.1186/s12881-015-0246-2>
- Feng Y, Ge X, Meng L, Scull J, Li J, Tian X, Zhang T, Jin W, Cheng H, Wang X, Tokita M, Liu P, Mei H, Wang Y, Li F, Schmitt ES, Zhang WV, Muzny D, Wen S, Chen Z, Yang Y, Beaudet AL, Liu X, Eng CM, Xia F, Wong LJ, Zhang J. The next generation of population-based spinal muscular atrophy carrier screening: comprehensive pan-ethnic SMN1 copy-number and sequence variant analysis by massively parallel sequencing. *Genet Med.* 2017 Aug;19(8):936-944. doi: 10.1038/gim.2016.215. Epub 2017 Jan 26. PMID: 28125085.
- Mittal B. Rapid molecular diagnosis of spinal muscular atrophy. *Indian J Med Res.* 2012;135(1):6-8. doi: 10.4103/0971-5916.93416. PMID: 22382175; PMCID: PMC3307186.
- Wittermer C, et al. Allele-specific amplification for pre-implantation genetic diagnosis (PGD) of spinal muscular atrophy. *Prenat Diagn* 2001; 21: 498-503.
- Ravard-Goulvestre C, Boucly C, Mathieu B, Van Amerongen G, Viollet L, Estournet B, et al. Allele-specific amplification for the diagnosis of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37: 133-5.
- Simsek M, Al-Bulushi T, Shanmugakonar M, Al-Barwani HS, Bayoumi R. Allele-specific amplification of exon 7 in the survival motor neuron (SMN) genes for molecular diagnosis of spinal muscular atrophy. *Genet Test* 2003; 7: 325-7.
- Xu R, Ogino S, Lip V, Fang H, Wu BL. Comparison of PCR-RFLP with allele-specific PCR in genetic testing for spinal muscular atrophy. *Genet Test* 2003; 7: 277-81.
- Zeng J, Lan F, Deng X, Ke L, Tu X, Huang L, et al. Evaluation of an in-house protocol for prenatal molecular diagnosis of SMA in Chinese. *Clin Chim Acta* 2008; 398: 78-81.
- Marini M, Sasongko TH, Watihayati MS, Atif AB, Hayati F, Gunadi, Zabidi-Hussin ZA, Ravichandran M, Nishio H, Zilfalil BA. Allele-specific PCR for a cost-effective & time-efficient diagnostic screening of spinal muscular atrophy. *Indian J Med Res.* 2012;135(1):31-5. doi: 10.4103/0971-5916.93421. PMID: 22382180; PMCID: PMC3307181.
- Wirth B. An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Mutat.* 2000;15(3):228-37. doi: 10.1002/

- (SICI)1098-1004(200003)15:3<228:AID-HUMU3>3.0.CO;2-9. PMID: 10679938.
16. Ahmadpour-Yazdi H, Hormozi-Nezhad M, Abadi A, Sanati MH, Kazemi B. Colorimetric Assay for Exon 7 SMN1/SMN2 Single Nucleotide Polymorphism Using Gold Nanoprobes. *Bioimpacts*. 2013;3(4):185-94. doi: 10.5681/bi.2013.037. Epub 2013 Dec 28. PMID: 24455482; PMCID: PMC3892738.
 17. Anhuf D, Eggermann T, Rudnik-Schöneborn S, Zerres K. Determination of SMN1 and SMN2 copy number using TaqMan technology. *Hum Mutat*. 2003 Jul;22(1):74-8. doi: 10.1002/humu.10221. PMID: 12815596.
 18. Cuscy I, Barcelly MJ, Baiget M, Tizzano EF. Implementation of SMA carrier testing in genetic laboratories: comparison of two methods for quantifying the SMN1 gene. *Hum Mutat*. 2002 Dec;20(6):452-9. doi: 10.1002/humu.10144. PMID: 12442269.
 19. Sawada T, Kido J, Sugawara K, Yoshida S, Ozasa S, Nomura K, Okada K, Fujiyama N, Nakamura K. Newborn screening for spinal muscular atrophy in Japan: One year of experience. *Mol Genet Metab Rep*. 2022 Aug 2; 32:100908. doi: 10.1016/j.ymgmr.2022.100908. PMID: 35942129; PMCID: PMC9356196.
 20. Mueller-Felber W. Newborn infant screening for spinal muscular atrophy: Chances and challenges. *Dev Med Child Neurol*. 2022 May;64(5):535. doi: 10.1111/dmcn.15152. Epub 2022 Feb 14. PMID: 35156200.
 21. Evidence-Based Review of Newborn Screening for Spinal Muscular Atrophy (SMA): Final Report (v5.2) (13 March 2018), commissioned by the ACHDNC.
 22. Stabley DL, Harris AW, Holbrook J, Chubbs NJ, Lozo KW, Crawford TO, Swoboda KJ, Funanage VL, Wang W, Mackenzie W, Scavina M, Sol-Church K, Butchbach ME. SMN1 and SMN2 copy numbers in cell lines derived from patients with spinal muscular atrophy as measured by array digital PCR. *Mol Genet Genomic Med*. 2015 Jul;3(4):248-57. doi: 10.1002/mgg3.141. Epub 2015 Mar 21. PMID: 26247043; PMCID: PMC4521962.

*Танилцаж, нийтлэх санал өгсөн:
Анагаах ухааны доктор, профессор П.Эрхэмбулган*