

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Birutė  
BURNYTĖ

# Genotipo ir fenotipo heterogeniškumo įvertinimas paveldimų neuropatijų grupėje

**DAKTARO DISERTACIJA**

Biomedicinos mokslai,  
medicina **06B**

---

VILNIUS 2018

Disertacija rengta 2014–2018 metais Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Biomedicinos mokslų instituto Žmogaus ir medicininės genetikos katedroje.

Mitochondrinės DNR mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba (sutarties Nr. TAP LLT-02/2015).

**Mokslinis vadovas – prof. dr. Algirdas Utkus** (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina, 06B)

**Mokslinis konsultantas – akad. prof. habil. dr. Vaidutis Kučinskas** (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija, 01B)

VILNIUS UNIVERSITY

Birutė  
BURNYTĖ

# Evaluation of Genetic and Phenotype Heterogeneity in Hereditary Neuropathies

**DOCTORAL DISSERTATION**

Biomedical Sciences,  
medicine **06B**

---

VILNIUS 2018

This dissertation was written between 2014 and 2018 at the Department of Human and Medical Genetics, Institute of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, Vilnius University. The mtDNA research was supported by Research Council of Lithuania grant No TAP LLT-02/2015.

**Academic supervisor – Prof. Dr. Algirdas Utkus** (Vilnius University, Biomedical sciences, Medicine, 06B)

**Academic consultant – Acad. Prof. Habil. Dr. Vaidutis Kučinskas** (Vilnius University, Biomedical sciences, Biology, 01B)

# TURINYS

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS .....	7
ĮVADAS .....	9
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	15
1.1. Periferinė nervų sistema .....	15
1.2. Paveldimos neuropatijos / <i>Charcot-Marie-Tooth</i> liga .....	15
1.3. CMT klasifikacija ir genetinė įvairovė .....	17
1.3.1. CMT1 .....	21
1.3.2. CMT2 .....	22
1.3.3. CMT-T .....	23
1.4. Distalinė PMN .....	24
1.5. Paveldima neuropatija su polinkiu į suspaudimo paralyžius (PNSP).....	27
1.6. Mitochondrijų disfunkcija ir vaidmuo neuropatijų patogenezeje ...	28
2. DARBO METODOLOGIJA .....	30
2.1. Tiriamieji .....	30
2.2. Tyrimo eiga .....	31
2.3. Branduolio genų ir mtDNR Sangerio sekoskaita .....	31
2.3.1. DNR išskyrimas .....	31
2.3.2. Oligonukleotidinių pradmenų sukūrimas .....	32
2.3.3. Ilga PGR .....	32
2.3.4. PGR .....	33
2.3.5. Elektroforezė agarozės gelyje ir PGR produktų valymas ....	35
2.3.6. Sekoskaitos reakcija .....	36
2.3.7. Sekoskaitos reakcijos produktų gryninimas ir tiesioginės nukleotidų sekos nustatymas Sangerio sekoskaita .....	37
2.4. Naujos kartos sekoskaita .....	37
2.5. Viso egzomo sekoskaita.....	40
2.6. Nustatytų genetinių pokyčių patvirtinimas .....	41
2.7. Statistinė analizė .....	41

3. TYRIMŲ REZULTATAI IR APTARIMAS .....	43
3.1. Kohortinio retrospektyvinio tyrimo rezultatai .....	43
3.1.1. Pacientų, kuriems diagnozuotas CMT1A potipis, fenotipų įvertinimas .....	43
3.1.1.1. CMT1A fenotipų charakteristikų aptarimas .....	47
3.1.2. Paveldimos neuropatijos su polinkiu į suspaudimo paralyžius pacientų fenotipų charakteristika .....	49
3.1.2.1. PNSP fenotipo ypatumų aptarimas .....	50
3.2. Kohortinio perspektyvinio tyrimo rezultatai .....	51
3.2.1. Fenotipų, kuriuos lėmė mtDNR patogeniniai variantai, įvertinimas .....	51
3.2.1.1. Patogeninių mtDNR variantų ir fenotipų aptarimas ..	57
3.2.2. <i>GJB1</i> geno sekoskaitos ir fenotipų charakterizavimas .....	59
3.2.2.1. <i>GJB1</i> genotipų ir fenotipų aptarimas .....	66
3.2.3. <i>MPZ</i> geno tyrimas ir fenotipų ypatumai .....	68
3.2.3.1. <i>MPZ</i> geno naujų patogeninių variantų reikšmė .....	71
3.2.4. <i>MFN2</i> geno tyrimas ir fenotipo įvertinimas .....	72
3.2.4.1. <i>MFN2</i> genotipo ir fenotipo sąsajos .....	75
3.2.5. <i>PMP22</i> geno tyrimas ir fenotipo įvertinimas .....	77
3.2.5.1. <i>PMP22</i> genotipo ir fenotipo rezultatų aptarimas ....	78
3.2.6. Mitochondrinės DNR <i>MT-ATP6/8</i> genų tyrimai <i>Charcot–Marie–Tooth</i> liga sergantiems pacientams .....	79
3.2.6.1. <i>MT-ATP6/8</i> genų patogeniniai variantai – reta <i>Charcot–Marie–Tooth</i> ligos priežastis .....	80
3.2.7. Naujos kartos sekoskaitos tyrimo efektyvumas paveldimų neuropatijų grupėje .....	80
3.2.7.1. Tikslinio genų rinkinio taikymo reikšmė <i>Charcot–Marie–Tooth</i> liga sergančių pacientų molekulinėje diagnostikoje .....	91
3.2.8. Viso egzomo sekoskaitos rezultatai .....	93
3.2.8.1. Viso egzomo sekoskaitos reikšmė neuroraumeninių ligų diagnostikoje .....	94
3.2.9. Apibendrinimas .....	95
4. IŠVADOS .....	100
5. METODINĖS REKOMENDACIJOS .....	101
LITERATŪROS SĄRAŠAS .....	103
PRIEDAI .....	118

## SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

- AD – autosominis dominantinis
- ADOA – autosominė dominantinė regos nervų atrofija
- AHS – *Alpers–Huttenlocher* sindromas
- AR – autosominis recesyvus
- ClinVar* – viešasis duomenų archyvas, kuriame kaupiamos žmogaus genomo pakaitos ir jų poveikis fenotipui
- CMT – *Charcot–Marie–Tooth* liga
- CMT1A – 1A tipo *Charcot–Marie–Tooth* liga
- CMT2 – 2 tipo *Charcot–Marie–Tooth* liga
- CMTX1 – 1X tipo *Charcot–Marie–Tooth* liga
- CNS – centrinė nervų sistema
- ddNTP – dideksinukleozidotrifosfatas
- dNTP – deksinukleozidotrifosfatas
- dPMN – distalinė paveldima motorinė neuropatija
- EMG – elektromiografija
- ENG – elektroneurografija
- ExAC* – egzomų kaupimo ir saugojimo konsorciumas
- KSS – *Kearns–Sayre* sindromas
- LHON – Leberio paveldima optinė neuropatija
- LPIO – lėtinė progresuojanti išorinė oftalmoplegija
- m/s – metrai per sekundę
- MELAS – mitochondrinė encefalopatija, laktacidozė, į insultą panašūs epizodai
- MEMSA – mioklonijos, epilepsija, miopatija, sensorinė ataksija
- MERFF – miokloninė epilepsija ir raudonos netolygios skaidulos
- MIRAS – mitochondrinis recesyvios ataksijos sindromas
- MNGIE – mitochondrinė neurogastrointestinalinė encefalopatija
- MRT – magnetinio rezonanso tomografija
- MPZ – mielino baltymas 0
- ms – milisekundės
- MVVP – motorinio vieneto veikimo potencialas
- NARP – neurogeninis raumenų silpnumas, ataksija ir pigmentinis retinitas
- NKS – naujos kartos sekoskaita
- NLG – nervinio impulso laidumo greitis
- PMP22 – periferinis mielino baltymas 22

- PMSN – paveldima motorinė ir sensorinė neuropatija
- PN – paveldima neuropatija
- PNS – periferinė nervų sistema
- PNSP – paveldima neuropatija su polinkiu į suspaudimo paralyžius
- PSAN – paveldima sensorinė ir autonominė neuropatija
- SANDO – sensorinė ataksija, neuropatija, dizartrijs ir oftalmoparezė
- VES – viso egzomo sekoskaita
- VGS – viso genomo sekoskaita



## ĮVADAS

Paveldimos neuropatijos – plati ir etiologiškai heterogeniška paveldimų ligų grupė. Visų šių ligų klinikiniai fenotipai persidengia. Taip pat galimi ir deriniai su kitų ligų mechanizmais.

Paveldimos neuropatijos, remiantis jų kilme, skirstomos į neuropatijas, kai neuropatija yra pagrindinis ligos simptomas (pvz., *Charcot–Marie–Tooth* liga (CMT), paveldimos sensorinės ir autonominės neuropatijos (PSAN), distalinės paveldimos motorinės neuropatijos (dPMN ir kt.)), ir neuropatijas, kai klinikinis neuropatijos pasireiškimas yra išplitusio neurologinio ar daugiasistemos sutrikimo dalis. Šiuo metu patogeniniai variantai, lemiantys paveldimas neuropatijas ir susijusius fenotipus, aiškiai aprašyti daugiau kaip 100 genų, tačiau didelė dalis iki šiol nežinomų genetinių priežasčių vis dar lieka neišaiškinta. Skiriamos autosominės dominantinės, autosominės recesyvios, su X chromosoma sukibusios ir mitochondrinio paveldėjimo būdu paveldimos formos. Pirminės mitochondriopatijos taip pat gali pasireikšti kaip periferinės neuropatijos.

Naujos kartos sekoskaitos (NKS) technologijų taikymas, tiriant paveldimas neuropatijas, nuolat didina genetinių priežasčių dažnį. Atsižvelgdami į didėjančių neuropatijų genetinių priežasčių sudėtingumą, šiame darbe siekėme pasiūlyti molekulinės diagnostikos algoritmą. Nors etiologinio paveldimų neuropatijų gydymo iš tikrųjų dar nėra, žinoti sutrikimo priežastį daugeliui pacientų svarbu, nes nebereikia toliau ieškoti galimų ligos priežasčių ir įmanoma konkrečiai išnagrinėti galimą ligos pasikartojimo tikimybę pacientų vaikams ir kitiems šeimos nariams.

Visame pasaulyje dedama daug pastangų tiriant paveldimų neuropatijų priežastis. Rašant šį darbą *PubMed* duomenų bazėje pagal paieškos kriterijų „paveldėta neuropatija“ buvo paskelbta daugiau nei 5 000 publikacijų apie šiuos sutrikimus. Tiksli molekulinė diagnozė svarbi, jei norime identifikuoti pacientus tolesniems tyrimams, įskaitant ir naujų gydymo metodų klinikinius tyrimus. Šiuo metu įvairiose šalyse, taip pat ir Lietuvoje, dažniausiai atliekamas etapinis pacientų genetinis tyrimas, kuris remiasi nervų laidumo greičio nustatymu, ligos paveldėjimo modeliu šeimoje ir paplitimu sergančiųjų populiacijoje. Norvegijoje atliktame darbe buvo nagrinėjami 549 CMT sergančių pacientų tyrimai ir genetinės priežastys, nustatytos šalies diagnostikos laboratorijose. Beveik 96 proc. šių pacientų nustatyti patogeniniai variantai tik keturiuose genuose (*PMP22* duplikacija, *GJB1*, *MPZ* ir *MFN2*), siejamuose

su CMT (Ostern et al., 2013). Šios genetinės išvados atitinka tas, kurios buvo pateiktos ir kitose šalyse. Jungtinėje Karalystėje ištyrus 1 607 pacientus daugiau kaip 90 proc. pacientų nustatytos CMT priežastys tuose pačiuose keturiuose genuose (Murphy et al., 2012). Danijoje, kurioje CMT1A genetinės srities tyrimas pradėtas 1990 metais, įvertinus 1992–2012 metų tirtų 1 442 pacientų tyrimų rezultatus nustatyta, kad molekulinė diagnozė tiriant keturias pagrindines genetines CMT sritis patvirtinta tik 21,6 proc. pacientų (Vaeth et al., 2017). Vengrijoje 531 CMT sergančio paciento grupėje *PMP22* duplikacija nustatyta 40,5 proc., o *GJB1* geno patogeniniai variantai sudarė 9,2 proc. (Milley et al., 2018). Rusijoje ištyrus 174 CMT sergančius pacientus, *PMP22* duplikacija nustatyta 59 pacientams ir sudarė 33,9 proc. (Mersiyanova et al., 2000). Lietuvoje CMT1A genominės srities tyrimas pradėtas 2000 metais, o antros pagal dažnį priežasties – *GJB1* geno – tik 2010 metais. Šio darbo tikslas buvo nustatyti dažniausias ir rečiau nustatomas genetines priežastis paveldimomis neuropatijomis sergančių pacientų grupėje taikant Sangerio sekoskaitos ir naujos kartos sekoskaitos metodus.

#### Darbo naujumas, aktualumas ir reikšmė

Mokslinių darbų, tiriančių paveldimų neuropatijų etiologijos priežastis ir paplitimą, Lietuvoje nėra atlikta.

Lietuvoje paveldimomis neuropatijomis sergančių pacientų molekulinį tyrimų strategija nėra apibrėžta. Šiuo darbu buvo siekiama nustatyti dažniausias molekulinės genetines CMT priežastis Lietuvoje ir patobulinti CMT sergančių pacientų molekulinės diagnostikos strategiją, kuri būtų naudinga teikiant asmens sveikatos priežiūros paslaugas pacientams ir taip pat būtų naudinga juos prižiūrintiems gydytojams.

MtDNR sekoskaitos tyrimas diagnostinėje klinikinės genetikos praktikoje Lietuvoje nebuvo atliekamas. Darbo metu gauti rezultatai leido identifikuoti mtDNR molekulinės sutrikimų priežastis pacientų, sergančių pirminiais mitochondriniais sindromais, grupėje. Darbo rezultatai parodė, kad mtDNR molekuliniai tyrimai yra naudingi pacientams ir svarbūs diferencijuojant šias fenotipiškai heterogenines ligas.

Darbo metu identifikuoti nauji patogeniniai variantai suteikė daugiau naujų žinių apie paveldimų neuropatijų molekulinę etiologiją.

## Tyrimo tikslas

Nustatyti žinomus ir naujus genetinius pokyčius ir įvertinti genotipo ir fenotipo heterogeniškumą pacientų, sergančių paveldimomis neuropatijomis, grupėje.

## Tyrimo uždaviniai

1. Nustatyti 1A tipo *Charcot–Marie–Tooth* ligos pasiskirstymą *Charcot–Marie–Tooth* liga sergančių asmenų grupėje, išanalizuoti fenotipo heterogeniškumą pacientams, kuriems diagnozuota 1A tipo *Charcot–Marie–Tooth* liga ir paveldima neuropatija su polinkiu į suspaudimo paralyžius, ir nustatyti fenotipo pasireiškimo priklausomybę nuo lyties 1A tipo *Charcot–Marie–Tooth* liga sergančių pacientų grupėje.
2. Ištirti pagrindinius su *Charcot–Marie–Tooth* liga siejamus genus (*GJB1*, *MPZ*, *MFN2*), įvertinti nustatytų patogeninių variantų dažnį ir poveikį fenotipui *Charcot–Marie–Tooth* liga sergančių pacientų grupėje.
3. Ištirti *MT-ATP6/8* genetinę sritį 2 tipo *Charcot–Marie–Tooth* ir tarpinio tipo *Charcot–Marie–Tooth* liga sergančių pacientų grupėse, įvertinti nustatytų patogeninių variantų dažnį ir poveikį fenotipui šiose grupėse.
4. Nustatyti ir įvertinti mitochondrinės DNR patogeninių variantų dažnį ir neuropatijos klinikinį pasireiškimą klasikinių mitochondrinių sindromų pacientų grupėje.
5. Įvertinti su *Charcot–Marie–Tooth* liga siejamų genų rinkinio diagnostinę vertę atrinktų *Charcot–Marie–Tooth* liga sergančių pacientų grupėje.

## Ginamieji teiginiai

1. Įtarus klasikinį mitochondrinį sindromą, pirmiausia būtina ištirti dažniausius patogeninius mtDNR variantus, o vėliau, jei molekulinė diagnozė lieka nenustatyta, atlikti visos mtDNR sekos tyrimą.
2. 1A tipo *Charcot–Marie–Tooth* ligos pasiskirstymas ir fenotipų pasireiškimas sergančių *Charcot–Marie–Tooth* liga pacientų grupėje nesisiria nuo literatūros duomenų.
3. *GJB1* geno patogeniniai variantai yra antroji dažniausia molekulinė priežastis pacientams, sergantiems *Charcot–Marie–Tooth* liga.
4. Naujos kartos sekoskaitos technologija pagrįsti tyrimai yra efektyvi priemonė racionaliai paveldimų neuropatijų molekulinei diagnozei nustatyti.

## Darbo aprobacija

### *Publikacijos darbo tema:*

1. Burnytė, B., Kapitanova, N., Uktverytė, I., Utkus, A. (2015). Naujos kartos genetiniai tyrimai, diagnozuojant paveldimas periferines neuropatijas. *Neurologijos seminarai*, 19(63), 13–18.
2. Pelna, D., Burnyte, B., Jankevics, E., Lace, B., Dageyte, E., Grigalioniene, K., Utkus, A., Krumina, Z., Rozentale, J., Adomaitiene, I., Stavusis, J., Pliss, L., Inashkina, I. (2017). Complete mtDNA sequencing reveals mutations m.9185T>C and m.13513G>A in three patients with Leigh syndrome. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal*. Dec 12, 1–6. doi: 10.1080/24701394.2017.1413365. [Epub ahead of print]
3. Burnytė, B., Ambrozaitytė, L., Sereikė, I., Maculevičienė, I., Morkūnienė, A., Kučinskas, V., Utkus, A. (2018). *MFN2* aksonopatija: klinikinis atvejis. *Laboratorinė medicina*, 20(1), 41–45.

### *Žodiniai pranešimai:*

1. Burnytė, B. Paveldimos neuropatijos: epidemiologinė ir mutacijų analizė *GJB1* gene. 2016 m. jaunųjų mokslininkų konferencija „Bioateitis: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos“. Lietuvos mokslų akademija, 2016-12-07.
2. Burnytė, B., Ambrozaityte, L., Morkuniene, A., Baronas, K., Kavaliauskiene, I., Kucinskas, V., Utkus, A. Genetic diagnostic utility in a cohort of patients with hereditary neuropathy. XIV Baltic Congress of Laboratory Medicine. Vilnius, May 10-12, 2018.
3. Grigalioniene, K., Burnyte, B., Zukauskaitė, G., Vanseviciute, D., Utkus, A. Comprehensive analysis of mitochondrial DNA in patients with suspected mitochondrial disorder. XIV Baltic Congress of Laboratory Medicine. Vilnius, May 10-12, 2018.

### *Stendiniai pranešimai:*

1. Burnyte, B., Uktveryte, I., Vaitkevicius, A., Ambrozaityte, L., Kucinskas, V., Utkus, A. *GJB1* gene mutation c.34G>A in a Lithuanian family. *European Journal of Human Genetics*. London, Nature Publishing Group. ISSN 1018-4813. 23, Supplement 1. 2015, p. 422.
2. Burnyte, B., Inashkina, I., Lace, B., Pelna, D., Molyte, A., Grigalioniene, K., Kucinskas, V., Utkus, A. Implementing the survey of disease natural

- history as a tool to collect complex information on mitochondrial patients in Lithuania and Latvia. *European Journal of Human Genetics*. London: Nature Publishing Group, 2016, vol. 24, e-Supplement 1, p. 431.
3. Burnytė, B., Kavaliauskienė, I., Aleksūnienė, A., Abelytė, R., Utkus, A. Two separate genetic conditions in a single patient: case report. *Laboratorinė medicina*. 2017, 19 1(73), p. 79.
  4. Grigalionienė, K., Burnyte, B., Kucinskas, V., Utkus, A. MtDNA sequence analysis in the group of Lithuanian patients with clinically suspected mitochondrial disease. European Human Genetics Conference 2017, Copenhagen, Denmark, May 27-30 [elektroninis išteklius]. Copenhagen: ESHG, 2017.
  5. Burnyte, B., Kavaliauskiene, I., Molyte, A., Ambrozaityte, L., Rancelis, T., Morkuniene, A., Matuleviciene, A., Tumiene, B., Kucinskas, V., Utkus, A. Novel mutations of the *GJB1* gene associated with Charcot-Marie-Tooth type 1X in Lithuanian cohort. European human genetics conference 2017, Copenhagen, Denmark, May 27-30 [elektroninis išteklius]. Copenhagen: ESHG, 2017. abstract no p10.23c.
  6. Burnyte, B., Grigalioniene, K., Burokiene, V., Besusparis, J., Ambrozaityte, L., Utkus, A. Diagnostic management challenges in an infant with possible diagnosis of mitochondrial disease. 14th Conference of the Baltic Child Neurology Association (BCNA): May 18-20, 2017, Riga, Latvia: program and abstracts / Baltic Child Neurology Association (BCNA). Riga: Baltic Child Neurology Association (BCNA), 2017, p. 27.
  7. Burnyte, B., Kavaliauskiene, I., Ambrozaityte, L., Morkuniene, A., Matuleviciene, A., Tumiene, B., Kucinskas, V., Utkus, A. Phenotypical features and genetic findings in Lithuanian patients with CMTX1. American Society of Human Genetics 67th Annual Meeting, October 17-21, 2017, Orlando, Florida: poster abstracts. Rockville: ASHG, 2017, p. 327.
  8. Burnyte, B., Morkuniene, A., Ambrozaityte, L., Baronas, K., Kavaliauskiene, I., Sereike, I., Kucinskas, V., Utkus, A. The *MFN2* gene is rarely mutated in Lithuanian patients with Charcot-Marie-Tooth disease. XIV Baltic Congress of Laboratory Medicine. Vilnius, May 10-12, 2018.
  9. Burnyte, B., Morkuniene, A., Ambrozaityte, L., Regelskyte, V., Vaitkevicius, A., Kucinskas, V., Utkus, A. A report of a family of intermediate Charcot-Marie-Tooth disease with concomitant mutations in the *GNB4* and *DNM2* genes. European Conference of Human Genetics, Milan, June 16-19, 2018.

10. Burnytė, B., Grigalionienė, K., Vaitkevičius, A., Petroška, D., Cimbalistienė, L., Kučinskas, V., Utkus, A. Phenotypic heterogeneity in three patients with m.3243A>G mutation. International Congress on Neuro-muscular Diseases (ICNMD 2018), Vienna, Austria, July 6-10, 2018.
11. Burnyte, B., Grigalioniene, K., Cimbalistiene, L., Vaitkevicius, A., Petroska, D., Kucinskas, V., Utkus, A. Phenotypic spectrum of patients harbouring the m.3243A>G mutation. SSIEM 2018 Annual Symposium, Athens, Greece, September 4-7, 2018.
12. Burnyte, B., Ambrozaityte, L., Grigalioniene, K., Morkuniene, A., Baronas, K., Kucinskas, V., Utkus, A. Peripheral Neuropathies: Application of Targeted Next Generation Sequencing for Lithuanian Patients Cohort. ASHG 2018 Annual Meeting in San Diego, California, October 16-20, 2018.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Periferinė nervų sistema

Periferiniai nervai perduoda informaciją iš centrinės nervų sistemos (CNS), esančios galvos ir nugaros smegenyse, visoms kūno dalims ir siunčia šią informaciją atgal į CNS. Periferinių nervų skaidulos – aksonai – gali turėti mielininį dangalą arba ne. Periferinėje nervų sistemoje (PNS) ankstyvuojau vystymosi metu Švano (*Schwann*) ląstelės savo plazmine membrana pradeda dengti aksonus. Aksonai, kurių skersmuo yra didesnis nei 1  $\mu\text{m}$  (t. y. motoriniai neuronai ir sensoriniai neuronai, perduodantys mechaninę ir proprioceptinę informaciją), mielinizuojami po gimimo, o mažesni aksonai (dažniausiai nociceptiniai neuronai) jau būna apdengti. Mielinizacijos metu Švano ląstelė apšvina aplink vieną didelį aksoną ir pagamina labai specializuotą lipidų turinčią izoliacinę struktūrą – mieliną, kuris įgalina greitą veikimo potencialų pralaidumą aksone, maitina aksoną ir pagerina jonų, dalyvaujančių kylančio veikimo potencialui, laidumą Ranvjė (*Ranvier*) sąsmaukose (Grigoryan, Birchmeier, 2015). PNS esantis kompaktiškas mielinas, kurio daugiausia yra mielino membranoje, turi cholesterolio ir kitų lipidų, taip pat baltymų, tokių kaip mielino baltymas 0 (MPZ) ir periferinis mielino baltymas 22 (PMP22). Nekompaktiškas mielinas turi baltymų, tokių kaip su mielinu susijęs glikoproteinas ir koneksinas-32. Periferinių nervų struktūrinių baltymų pokyčiai dėl juos koduojančių genų patogeninių variantų lemia sutrikusią nervų funkciją ir neuropatiją.

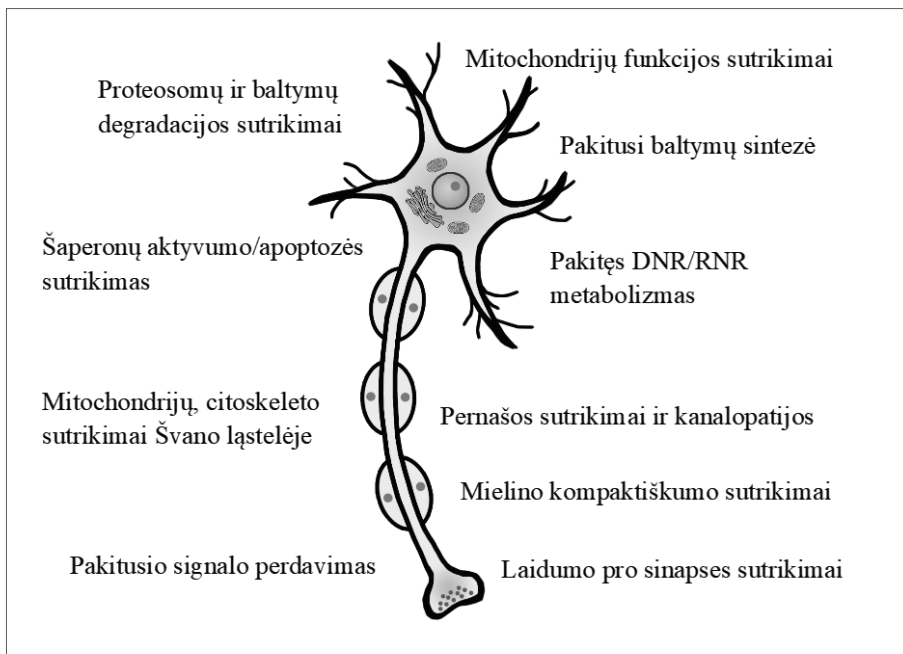
## 1.2. Paveldimos neuropatijos / *Charcot–Marie–Tooth* liga

Paveldimos neuropatijos (PN) yra kliniškai ir genetiškai heterogeniška PNS ligų grupė. Šias ligas lemia motorinių, sensorinių ir (arba) autonominių nervų pažeidimas, pirmiausia paveikiantis aksoną, ląstelės struktūrą arba mielininį dangalą. PN yra rečiau paplitusios nei įgytos neuropatijos. Plačiaja prasme PN skirstomos į dvi grupes – sindromines PN ir nesindromines PN. Sindrominės neuropatijos apima paveldimų ligų grupę, kuriose neuropatija yra simptomų grupės dalis. Jose neuropatija gali būti pirmasis arba vyraujantis simptomas, taip pat gali pasireikšti vėlesnėse stadijose progresuojant ligai. Sindrominės neuropatijos yra kai kurių nervų ir raumenų, neurodegeneracinių ligų ar paveldimų medžiagų apykaitos ligų bendro fenotipo dalis. Nepaisant to, didžiausią nesindrominių PN dalį sudaro *Charcot–Marie–Tooth* (CMT) liga, dar vadina-

ma paveldima motorine ir sensorine neuropatija (PMSN), kuria serga vidutiniškai 9,37–20,1 iš 100 000 gyventojų (Barreto et al., 2016). Klasikinis CMT fenotipas yra progresuojantis distalinių galūnių dalių raumenų silpnumas, atrofija ir jutimų praradimas. Pirmiausia patologinis procesas pasireiškia pėdose, palaipsniui plinta iki kelių ir vėlesnėse ligos stadijose pasireiškia rankų pažeidimo simptomai. Pacientams dažnai gali pasireikšti įvairūs papildomi simptomai, tokie kaip CNS sutrikimai, neurosensorinis klausos sutrikimas, regos nervų atrofija, katarakta ir balso klosčių paralyžius.

CMT paprastai pasireiškia vaikystėje ar paauglystėje, o CMT2 gali pasireikšti ir vėliau. CMT fenotipo sunkumas kinta nuo lengvų klasikinės CMT simptomų iki sunkių, kurie dažniausiai būdingi autosominiu recesyviu (AR) būdu paveldimai CMT. Skirtingas fenotipo pasireiškimas ir įvairus ligos sunkumo kintamumas tiek šeimoje, tiek tarp skirtingų asmenų daugelyje CMT potipių leidžia daryti prielaidą, kad aplinkos veiksniai, genetiniai modifikatoriai, stochastiniai veiksniai ir (arba) epigenetika gali turėti įtakos ligos pasireiškimui, nors kai kurie pacientai gali nepatirti simptomų per visą gyvenimą. Fenotipų skirtumų tarp CMT sergančių moterų ir vyrų nepastebėta. Išimti sudaro CMTX1 potipis, kai vyrams simptomai pasireiškia anksčiau ir sunkiau, o moterims – menčiau ir tai gali būti dėl atsitiktinės X chromosomos inaktyvacijos (Reilly, Murphy, Laura, 2011). Daugelį metų trunkantys klinikiniai ir genetiniai tyrimai parodė, kad CMT yra labiausiai heterogeniška neurodegeneracinė liga. CMT genai koduoja baltymus, kurių raiška vyksta Švano ląstelėse, sudarančiose mielino dangalą, ir neuronuose. Šie baltymai pasižymi skirtingomis funkcijomis, įskaitant mielino kompaktizaciją (tankinimą) ir palaikymą, pernašą pro mieliną, transkripcijos reguliavimą, susijusį su mielinizacija, ląstelių aktyvaciją, citoskeleto formavimą, aksoninę pernašą, mitochondrijų dinamiką ir metabolizmą, vezikulių ir endosomų išsidėstymą, šaperonus. Nepriklausomai nuo to, medžiagų apykaitos ar struktūrinis baltymo defektas pirmiausia paveikia mieliną ar aksoną, galutinis bendras periferinių neuropatijų patogenezės mechanizmas yra aksonų degeneracija, kuri dažniausiai apima didžiausias ir ilgiausias skaidulas (Scherer, Wrabetz, 2008). Aksonų signalai lemia, ar Švano (*Schwann*) ląstelė pakeis savo fenotipą ir formuos pakitusį mieliną. Kitu atveju Švano (*Schwann*) ląstelių anomalijos gali sukelti aksonų degeneraciją su demielinizacija ar be jos. Genetinis CMT heterogeniškumas atspindi unikalią periferinės nervų sistemos anatomiją ir metabolizmą (žr. 1 pav.).



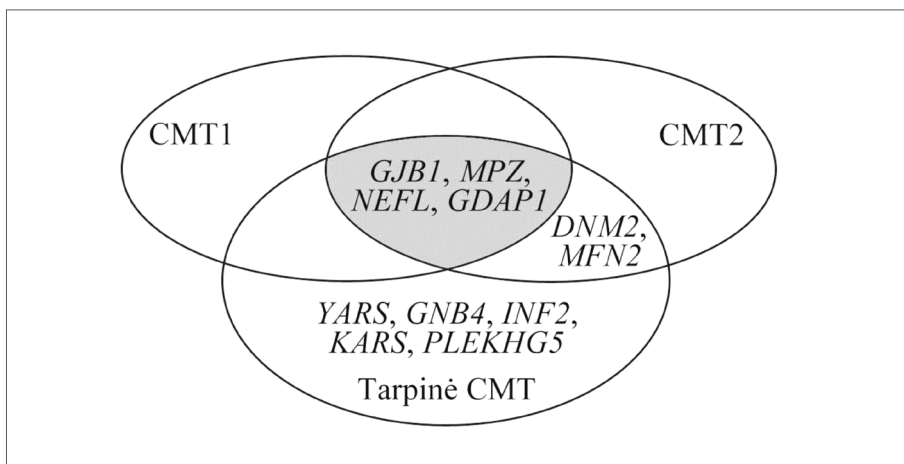


**1 pav.** Paveldimų neuropatijų patogenezės mechanizmai. Adaptuota pagal: Rossor et al., 2013.

### 1.3. CMT klasifikacija ir genetinė įvairovė

CMT ligos genų skaičius sparčiai išaugo nuo tada, kai 1991 metais buvo identifikuotas pirmas ligą lemiantis genas. Šiuo metu žinoma daugiau nei 100 skirtingų genų, kurių patogeniniai variantai lemia CMT ir kitas PN (<http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations>) (Rudnik-Schoneborn, Auer-Grumbach, Senderek, 2017). Klinikiniu ir neurofiziologiniu požiūriu CMT skirstoma į demielinizuojančią (CMT1), kai viršutinių galūnių vidurinio ar alkūninio nervų nervinio impulso laidumo greitis (NLG) < 38 m/s, aksoninę (CMT2), kai NLG > 38 m/s, ir tarpinę CMT (CMT-T), kai NLG tarp 25 ir 45 m/s (Bassam, 2014; Reilly et al., 2011). Paprastai CMT1 būdingas sulėtėjęs NLG, kuris koreliuoja su periferinių nervų mielininio dangalo degeneracija, o CMT2 būdingas sumažėjęs veikimo potencialas, nulemtas sumažėjusio aktyvių aksonų kiekio. O CMT-T būdingi ir demielinizacijos, ir aksonų degeneracijos požymiai. Be šių fenotipų, žinoma paveldima sensorinė ir autonominė neuropatija (PSAN), distalinė paveldima motorinė neuropatija (dPMN), paveldima sensorinė neuropatija (PSN), paveldima neuropatija su polinkiu į suspaudimo paralyžius (HNSP) (Klein, Duan, Shy, 2013). Kitas CMT skirstymas pagrįstas paveldė-

jimo būdu ir molekuliniais branduolio ar mitochondrijų genomo genetiniais pokyčiais. CMT gali būti paveldima autosominiu dominantiniu (AD), AR, su X chromosoma, taip pat ir mitochondrinio paveldėjimo būdu. Dažniausiai CMT paveldima AD būdu, o recesyvus paveldėjimas sudaro apie 10 proc. Europos populiacijose, taip pat retos CMT priežastys yra *de novo* mutacijos. Mitochondrinis paveldėjimo būdas yra dar retesnis. Neseniai buvo pasiūlyta keisti dabartinę CMT nomenklatūrą ir susijusius sutrikimus, atsižvelgiant į molekulinę genetinę priežastį, paveldėjimo būdus ir pirminį patologinį fenotipą (aksoninį, demielinizuojantį ar tarpinį) (Mathis et al., 2015). Paskelbtos kelios rekomendacijos, kurios padeda nustatyti, kuriuos su CMT siejamus genus analizuoti pirmiau pagal klinikinį fenotipą, ligos pradžios amžių ir ligos eigą. Vis dėlto tampa akivaizdu, kad klinikinis skirstymas tarp CMT1 ir CMT2 ne visada atitinka tam tikrą molekulinį skirtumą, nes su CMT1 susijusių genų patogeniniai variantai taip pat gali lemti CMT2 fenotipą arba su CMT siejamų genų patogeniniai variantai gali būti nustatomi sergantiems kitomis nervų ir raumenų ligomis (pvz., *TRPV4* geno patogeniniai variantai gali lemti CMT2, įgimtą neprogresuojančią distalinę nugaros raumenų atrofiją arba mentės ir šėvikaulio nugaros raumenų atrofiją). CMT tipai ir juos lemiantys branduolio ar mitochondrijų genomo pokyčiai apibendrinti 1 lentelėje. Persidengiantys CMT fenotipai pavaizduoti 2 paveiksle.



**2 pav.** Genetinis CMT heterogeniškumas

**1 lentelė.** Su neuropatijomis siejami genai pagal paveldėjimo tipą

CMT tipas	CMT potipis	Genas ar sritis	Papildomi požymiai	
CMT-I	Autosominis dominantinis	CMT1A	<i>PMP22</i> (duplikacija)	
		CMT1B	<i>MPZ</i>	
		CMT1C	<i>LITAF</i>	
		CMT1D	<i>EGR2</i>	
		CMT1F	<i>NEFL</i>	
			<i>FBLN5</i>	Kartais – amžinė geltonosios dėmės degeneracija
		CMT1E	<i>PMP22</i>	
	Autosominis recesyvus	CMT1	<i>GDAP1</i>	
		CMT1B1	<i>MTMR2</i>	
		CMT1B2	<i>SBF2</i>	Dažna ankstyva glaukoma
		CMT1C	<i>SH3TC2</i>	Dažna ankstyva skoliozė
		CMT1D	<i>NDRG1</i>	Tik romų tautybės asmenims
		CMT1E	<i>EGR2</i>	
		CMT1F	<i>PRX</i>	
		CMT1G	<i>HK1</i>	Tik romų tautybės asmenims
		CMT1H	<i>FGD4</i>	
		CMT1J	<i>FIG4</i>	
		ĮHN	<i>MPZ</i>	
			<i>PMP22</i>	
		<i>SURF1</i>	Daugumai pacientų <i>Leigh</i> sindromas	
Su X chromosoma	CMTX1	<i>GJB1</i>		
CMT-T	Autosominis dominantinis	CMTA <sup>a</sup>	10q24.1-25.1	
		CMTB	<i>DNM2</i>	
		CMTC	<i>YARS</i>	
		CMTD	<i>MPZ</i>	
		CMTE	<i>INF2</i>	Su židinine segmentine glomeruloskleroze
		CMTF	<i>GNB4</i>	
			<i>NEFL</i>	
			<i>MNF2</i>	
			<i>AARS</i>	
			<i>MD1</i>	
			<i>DCTN2</i>	
		Autosominis recesyvus	CMTA	<i>GDAP1</i>
CMTB <sup>a</sup>	<i>KARS</i>			
CMTC	<i>PLEKHG5</i>			
CMTD <sup>a</sup>	<i>COX6A1</i>			
Su X chromosoma	CMTX1		<i>GJB1</i>	
			<i>DRP2</i>	

CMT tipas	CMT potipis	Genas ar sritis	Papildomi požymiai	
CMT2	Autosominis dominantinis	CMT2A1	<i>KIF1B</i>	
		CMT2A2	<i>MFN2</i>	Kartais regos nervų atrofija, balso klosčių paralyžius
		CMT2B	<i>RAB7A</i>	
		CMT2C	<i>TRPV4</i>	Balso klosčių paralyžius
		CMT2D	<i>GARS</i>	Pradžia viršutinėse galūnėse
		CMT2E	<i>NEFL</i>	
		CMT2F	<i>HSPB1</i>	
		CMT2G	12q12-13.2	
		CMT2K	<i>GDAP1</i>	
		CMT2I/J	<i>MPZ</i>	
		CMT2L	<i>HSPB8</i>	
		CMT2M	<i>DNM2</i>	
		CMT2N	<i>AARS</i>	
		CMT2O	<i>DYNC1H1</i>	
		CMT2P	<i>LRSAM1</i>	
		CMT2Z	<i>MORC2</i>	
		CMT2Q	<i>DHTKD1</i>	
		CMT2U	<i>MARS</i>	
		CMT2W	<i>HARS</i>	
		PMSNO	<i>TFG</i>	Proksimalinių raumenų silpnumas
	CMT2T	<i>MME</i>	Vėlyva pradžia	
	dPMN VA	<i>BSCL2</i>		
		<i>DGAT2</i>		
		<i>DCAF8</i>	Aksonų hipertrofija	
	CMT2Y	<i>VCP</i>		
		<i>NAGLU</i>	Bialelinės patogeniniai variantai lemia IIIB tipo mukopolisacharidozę	
		<i>TUBB3</i>		
		<i>TTR</i>		
	Autosominis recesyvus	CMT2B1	<i>LMNA</i>	
		CMT2B2	<i>MED25</i>	
		CMT2H	<i>GDAP1</i>	
			<i>HINT1</i>	Kartais balso klosčių paralyžius
			<i>LRSAM1</i>	Neuromiotonija
		<i>TRIM2</i>		
		<i>IGHMBP2</i>		
Su X chromosoma		<i>MME</i>		
		<i>MFN2</i>	Vėlyva pradžia	
		<i>HSJ1</i>	Kartais regos nervų atrofija, balso klosčių paralyžius	
		<i>NEFL</i>		
		<i>SPG11</i>		
		<i>PNKP</i>		
		<i>REEP1</i>	Dažnai okulomotorinė apraksija	
		<i>SGPL1</i>	Diafragmos paralyžius	
		<i>GAN</i>		
		<i>SACS</i>	Aksonų hipertrofija	
		<i>MPV17</i>	Spastinė ataksija	
		<i>SLC25A46</i>	Navajo hepatopatija	
		<i>HADHB</i>	Regos nervų atrofija	
	<i>GJB1</i>	Mitochondrijų trifunkcinio baltymo stoka		
Mitochondrinis		<i>PDK3</i>		
		<i>MT-ATP6</i>		

Paaiškinimai: CMT – Charcot–Marie–Tooth, İHN – įgimta hipomielinizuojanti neuropatija, PMSN – paveldima motorinė ir sensorinė neuropatija, dPMN – distalinė paveldima motorinė neuropatija, \* fenotipai gali būti priskiriami prie CMT2. Adaptuota pagal: Rudnik-Schoneborn et al., 2017.

### 1.3.1. CMT1

CMT1, arba demielinizuojantį, tipą lemiančių genų patogeniniai variantai dažnai yra susiję su Švano ląstelių ir mielininio dangalo baltymais (žr. 1 lentelę), kurių funkcija labai skirtinga. Tai lemia fenotipo heterogeniškumą (Scherer, Wrabetz, 2008). Paveldėjimas gali būti AD, AR arba susijęs su X chromosoma. CMT1 sudaro vidutiniškai iki 80 proc. visų CMT (Braathen et al., 2011).

CMT1A, kuri lemia 1,5 Mb duplikacija 17p11.2 chromosomos srityje, apimanti *PMP22* geną, yra labiausiai paplitęs CMT potipis ir sudaro 60–70 proc. CMT1 (apie 40–50 proc. visų CMT atvejų) (England et al., 2009). *PMP22* genas koduoja 22 kD baltymą, kuris sudaro apie 2–5 proc. PNS mielino ir yra svarbus Švano ląstelių augimui ir diferenciacijai. Pernelyg didelė pakitusio *PMP22* gamyba slopina Švano ląstelių proliferaciją ir sudėtinių membranos komponentų skilimą ląstelėse (Banchs et al., 2009). Klinikiniai simptomai pasireiškia 1-ame–2-ame gyvenimo dešimtmetyje, paprastai vaikystėje. Būdingas lėtai progresuojančios grynos neuropatijos fenotipas, kurio pasireiškimas tos pačios šeimos sergantiems nariams gali būti skirtingas. Taip pat gali pasireikšti rankų tremoras, skoliozė, hipestezija, skausmas ir kiti papildomi simptomai. Aksonų disfunkcija lemia klinikinės ligos eigos sunkumą (Verhamme et al., 2009). Svarbu pabrėžti, kad *NLG* dažniausiai būna sulėtėjęs iki klinikinių simptomų pasireiškimo pradžios ir nekoreliuoja su ligos sunkumu. CMT1 taip pat lemia taškiniai *missense* patogeniniai variantai *PMP22* gene, dėl kurių baltymas įgyja toksinę funkciją ir kaupiasi Švano ląstelėse. Šių mutacijų lemti fenotipai kinta nuo lengvos eigos PNSP iki sunkios demielinizuojančios CMT1E.

CMT1, siejamas su *MPZ* geno patogeniniais variantais, sudaro 4,1–7,9 proc. (Fridman et al., 2015; Mandich et al., 2009). *MPZ* baltymas sudaro apie 50 proc. mielininio dangalo, o jo pokyčiai sutrikdo normalią mielinizaciją ir kompaktiškumą, įsiterpimą į plazminę membraną arba dėl dominuojančio neigiamo poveikio suardo mielina (Shy, 2006). Taigi, *MPZ* patogeniniams variantams būdingi įvairūs mechanizmai, apimantys funkcijos įgijimą, dominuojantį neigiamą poveikį, dalinį funkcijos netekimą ir hiperglikozilinimą. Ankstyvos pradžios sunki demielinizuojanti forma pasireiškia hipotonija ir judesių raidos sutrikimu kūdikystėje. Klasikinis demielinizuojantis fenotipas (CMT1B) paprastai pasireiškia anksti vaikystėje eisenos sutrikimais, dažniais griuvimais ir pėdų deformacijomis. Vėlyvos pradžios fenotipui būdinga aksonų degeneracija su minimaliais demielinizacijos požymiais.

Kitų genų *LITAF*, *EGR2*, *NEFL* ir *FBLN5* patogeniniai variantai lemia < 1 proc. visų CMT1 (Siskind et al., 2013). *LITAF* patogeniniams variantams būdingas klasikinis CMT1 fenotipas, tačiau silpniau pasireiškiantis nei

CMT1A (Guimaraes-Costa et al., 2017; Jerath, Shy, 2017). Fenotipo ir genotipo heterogeniškumas būdingas *EGR2* ir *NEFL* patogeniniams variantams. *EGR2* baltymas veikia kaip tiesioginis mielino baltymų, ypač MPZ, transkripcijos veiksnys, todėl yra svarbus mielinizacijos procese. *NEFL* dalyvauja intraląstelinėje aksonų ir dendritų pernašoje (Jordanova et al., 2003). Pirmieji simptomai paprastai pasireiškia anksti, dažnai kartu su CNS disfunkcija, balso klosčių paralyžiumi, kvėpavimo nepakankamumu (Horga et al., 2017). AR būdu paveldimą CMT1 dažniau lemia *EGR2* geno patogeniniai variantai.

### 1.3.2. CMT2

Pacientai, kuriems pasireiškia aksoninio tipo CMT2, sudaro apie 20 proc. visų atvejų (Rossor, Tomaselli, Reilly, 2016). Pagrindinis patologinis požymis – nuo ilgio priklausomų didelių mielinizuotų skaidulų degeneracija su regeneracijos ir aksonų atrofijos požymiais. Amžius, kai pasireiškia pirmieji simptomai, kinta nuo pirmojo iki septintojo gyvenimo dešimtmečio, o besimptomų, jaunų asmenų liga gali ilgai išlikti neapibrėžta (Timmerman et al., 1996). Paveldėjimo būdas dažniausiai yra AD, žymiai rečiau nustatomas AR ir mitochondrinis paveldėjimas. AR būdu paveldimai CMT2 būdingas simptomų pasireiškimas anksti vaikystėje ir greitas ligos progresavimas, o mitochondriniam – labiau kompleksinis fenotipas. Taip pat nustatyta, kad *GJB1* patogeniniai variantai identifikuoti šeimose, kuriose aprašyti CMT2 fenotipai (Vance, 2000). Šiuo metu žinoma daugiau nei 30 genų, kurių patogeniniai variantai lemia CMT2 (žr. 1 lentelę).

CMT2A yra labiausiai paplitęs CMT2 potipis, kurį lemia *MFN2* geno patogeniniai variantai, ir sudaro 20 proc. visų CMT2 atvejų (Verhoeven et al., 2006; Zuchner et al., 2006). Mitofuzinas 2 yra didelis branduolio deoksiribonukleorūgšties (DNR) koduojamas baltymas, esantis išorinėje mitochondrijų membranoje, dalyvaujantis mitochondrijų sintezėje, joms dalijantis ir judant, susidarant ląstelės ryšiams tarp mitochondrijų ir endoplazminio tinklo, taip pat mitofagijoje (de Brito, Scorrano, 2008). Trūkstant *MFN2* baltymo, prarandami mitochondrijų ir endoplazminio tinklo ryšiai, lemiantys kalcio homeostazės sutrikdymą ir endoplazminio tinklo fragmentaciją (Singaravelu et al., 2011). Daugumai pacientų (80 proc.), sergančių CMT2A, išsivysto sunki periferinė neuropatija, kuri dažniausiai gali būti motorinė arba kartu su ryškiu giliųjų jutimų sutrikimu. Taigi, klasikinei ligos formai būdingas fizinis silpnumas, pėdų deformacija (*pes cavus*), eisenos sutrikimai ir arefleksija, o judėjimo funkcija prarandama iki 20 metų amžiaus. Kitiems pacientams pasireiškia vėlyvos pradžios liga ir lengvesnės eigos fenotipas (Zuchner et al., 2004).

Tačiau yra tam tikras fenotipo kintamumo laipsnis, todėl kartais periferinė neuropatija gali komplikuotis į poūmį regėjimo sutrikimą ir regos nervų atrofiją.

Vyraujantys jutimo sutrikimai dažniau būdingi *RAB7*, *SPTLC1* ir *SPTLC2* genų patogeniniams variantams, nors šie genai siejami su PSN (Rotthier et al., 2010; Verhoeven et al., 2003). Tačiau reikėtų išskirti *SPTLC1* geno patogeninių variantų nulemtą fenotipą, kuriam būdingas neuropatinis skausmas. Motorinių nervų pakenkimas būdingas *GARS*, *HSPB1*, *HSPB8* ir *TRPV4* (Rossor et al., 2016; Verhoeven et al., 2003). Vyraujanti viršutinių galūnių neuropatija ir tarpdėlnakaulinių raumenų atrofija dažniausiai būdinga *GARS* geno patogeniniams variantams (Antonellis et al., 2003; Sivakumar et al., 2005), o apatinių galūnių – *HSPB1* ir *HSPB8* (Capponi et al., 2011). *TRPV4* geno patogeniniams variantams būdingas labai įvairus klinikinis pasireiškimas (Evangelista et al., 2015). Šių keturių genų patogeniniai variantai taip pat lemia dPMN. Nedidelei daliai CMT2 pacientų nustatomi patogeniniai variantai *NEFL*, *MPZ* ar *GDAP1* genuose, kurie taip pat siejami ir su demielinizuojančia bei CMT-T (Garcia-Sobrinho et al., 2017; Horga et al., 2017). Kitų su CMT2 siejamų genų pokyčiai nustatyti tik pavienėse šeimose.

### 1. 3.3. CMT-T

CMT-T tipą dažniausiai lemia *GJB1* geno patogeniniai variantai, paveldimi su X chromosoma. Tai antras pagal dažnį genas, kurio patogeniniai variantai nustatomi vidutiniškai 10 proc. visų CMT pacientų (Saporta, Shy, 2013). Vyrams pirmieji simptomai dažniausiai pasireiškia antrojo dešimtmečio pradžioje ir pasižymi progresuojančiu distalinių raumenų ir gana ankstyvu rankų, ypač nykščio pakylos raumenų, silpnumu, taip pat giliųjų sausgyslių refleksų ir jutimo praradimu. Moterims simptomai menkliau išreikšti, o kartais – visai nepasireiškia. Kai kuriems pacientams pasireiškia CNS simptomai. Neseniai nustatyta, kad X chromosomoje esančio *DRP2* geno patogeniniai variantai taip pat lemia CMT-T tipą (Brennan et al., 2015). Nenustačius patogeninių variantų *GJB1* gene arba jei genealogijoje liga perduodama per tėvo liniją sūnams, CMT-T tipui priskirti pacientai skirstomi pagal paveldėjimo būdą. Šiuo metu žinomi šeši genai, kurių patogeniniai variantai lemia AD būdu paveldimą CMT-T, iš kurių tik *YARS* nebūdingas fenotipo heterogeniškumas. Kitų, su CMT-T siejamų, genų pokyčiams būdingas fenotipų heterogeniškumas. *DNM2* geno patogeniniai variantai taip pat lemia CMT2 ir kitas paveldimas raumenų ligas bei išsiskiria įvairiu fenotipo pasireiškimu, kartais su neutropenija ir katarakta (Claeys et al., 2009). *INF2* geno patogeniniai variantai lemia CMT-T ir židininę segmentinę glomeruloskle-

rozę (Boyer et al., 2011). *MPZ*, *GNB4* ir *NEFL* genų patogeniniai variantai taip pat siejami su CMT1 ir CMT2 tipais. Žymiai rečiau nustatomi AR būdu paveldimi potipiai, kurie dažniausiai pasireiškia kitais papildomais požymiais, tokiais kaip, pavyzdžiui, psichomotorinės raidos sutrikimas ir vestibulinės neurinomos esant *KARS* geno mutacijoms.

#### 1.4. Distalinė PMN

dPMN yra kliniškai ir genetiškai įvairialypiai sutrikimai, kuriuos sukelia apatinių motorinių neuronų disfunkcija (Rossor et al., 2012). Klasikinis dPMN fenotipas yra nuo ilgio priklausomas motorinis silpnumas ir atrofija, iš pradžių paveikiantis vidinius pėdos raumenis ir šėivinę kojos dalį, dažnai sukeliantis pėdų deformacijas ir kojų pirštų fleksinę deformaciją. Dažniausiai ligos eiga progresuoja lėtai, palaipsniui pažeidžiami proksimaliniai kojų raumenys arba vidiniai rankų raumenys. Įvairus amžius, kai pasireiškia pirmieji simptomai, nevienodi klinikiniai simptomai ir susiję neurologiniai ypatumai komplikuoja fenotipą ir prisideda prie klinikinio detalesnio skirstymo. Įgimtos ar kūdikystėje prasidedančios neprogresuojančios kojų silpnumo ir atrofijos formos priskiriamos nugaros raumenų atrofijai, kai dominuoja apatinių galūnių simptomai (SMA-LED). Kiti dPMN klinikiniai pogrupiai yra skirstomi remiantis papildomomis savybėmis. dPMN yra vadinama grynai motorine CMT ligų grupe, nors daugeliui pacientų pasireiškia silpni jutimų sutrikimai, o to paties geno patogeniniai variantai gali lemti tiek dPMN, tiek CMT2. PMN diferencinę diagnostiką gali apsunkinti nugaros raumenų atrofija, spastinė paraplėgija ar kiti neurologiniai sutrikimai. Su dPMN susiję patogenezės mechanizmai apima DNR/RNR metabolizmą, baltymų transliaciją ir sintezę, atsaką į stresą, apoptozę, aksonų orientaciją, tarpląstelinę pernašą ir sinapsių aktyvumą. Mitochondrijų pakitimai yra dažni visose motorinių neuropatijų formose ir prisideda prie simptomų, keisdami mitochondrijų sintezę ar dalijimąsi (*MFN2*, *DNM2*, *SLC25A46*), aksoninę pernašą (*HSPB1*, *HSPB8*), baltymų sintezę (*C12orf65*, *SACS*) arba kofaktorių (*SLC52A2/3*) (Davidson et al., 2012; Patel, 2018; Van Den Bosch, Timmerman, 2006). Patogeninių variantų nustatymas tuose pačiuose dPMN ir motorinių CMT genuose rodo, kad dPMN neturėtų būti klasifikuojama kaip atskira ligų grupė.

PSAN pasireiškia įvairiais jutimų sutrikimais (menki refleksai, pasikeitęs skausmo ir temperatūros jautimas) ir autonominės disfunkcijos požymiais (gastroezofaginis refluksas, hipertenzija, gausus prakaitavimas). Šis tipas daug retesnis, palyginti su kitais PN tipais. Skausmingi odos pažeidimai ir



opos, lydimi distalinių jutimų sutrikimų ir sunkiai išgaunamų giliųjų sausgyslių refleksų, yra būdingi PSAN simptomai. Kartais pasireiškia kaulų ar sąnarių pažeidimo simptomai. PSAN skiriasi tuo, kad motorinių nervų pažeidimo nėra arba jis minimalus. Tačiau kartais PSAN simptomai gali imituoti sensorines ataksijas. Autonominės nervų sistemos simptomai skiriasi ir priklauso nuo to, kuris pakitęs baltymas dalyvauja patogenezėje. Dažniausiai nustatomi *SPTLC1* geno patogeniniai pokyčiai. Pastaruoju metu su PSAN siejamų genų sąrašas išsiplėtė, tačiau, nepaisant to, visi šiuo metu žinomi genai paaiškina tik 10–20 proc. atvejų (Saporta et al., 2011). Dabartinė dPMN ir PSAN klasifikacija pateikta 2 lentelėje.

**2 lentelė.** dPMN ir PSAN klasifikacija

CMT tipas	Genas ar sritis	Pagrindiniai požymiai		
dPMN	Autosominis dominantinis	<i>HSPB8</i>		
		<i>HSPB1</i>		
		<i>HSPB3</i>		
		<i>FBXO38</i>		
		<i>GARS</i>	Vyrauja viršutinių galūnių simptomai	
		<i>REEP1</i>	Vyrauja viršutinių galūnių simptomai	
		<i>BSCL2</i>	Vyrauja viršutinių galūnių simptomai, spastiškumas	
		<i>SLC5A7</i>	Balso klosčių paralyžius	
		<i>DCTN1</i>	Balso klosčių paralyžius	
		<i>TRPV4</i>	Mentės ir šėvikaulio bei įgimta distalinė nugaros raumenų atrofija	
		<i>WARS</i>		
		<i>SETX</i>	Viršutinio motorinio neurono pažeidimo simptomai	
		<i>AARS</i>		
		<i>DYNC1H1</i>	Proksimalinis apatinių galūnių silpnumas	
		<i>BICD2</i>	Įgimtos kontraktūros, proksimalinis apatinių galūnių silpnumas	
		<i>HARS</i>		
		<i>CHCHD10</i>		
		<i>SYT2</i>	Presinapsinis įgimtas miastenijos sindromas, distalinių raumenų atrofija	
		Autosominis recesyvus	<i>IGHMBP2</i>	Diafragmos paralyžius
			<i>HSJ1</i>	
<i>PLEKHG5</i>				
<i>SIGMARI</i>				
<i>HSPB1</i>				
Su X chromosoma	<i>ATP7A</i>	Kai kurie patogeniniai variantai lemia Menkes ligą		
Mitochondrinis	<i>ATP6/8</i>	Tie patys patogeniniai variantai lemia NARP ar Leigh sindromą		

CMT tipas		Genas ar sritis	Pagrindiniai požymiai
PSAN	Autosominis dominantinis	<i>SPTLC1</i>	
		<i>SPTLC2</i>	
		<i>RAB7</i>	
		<i>ATL1</i>	
		<i>ATL3</i>	
		<i>DNMT1</i>	
		<i>SCN11A</i>	Įgimtas nejautrumas skausmui
	Autosominis recesyvus	<i>WNK1</i>	
		<i>FAM134B</i>	
		<i>KIF1A</i>	
		<i>IKBKAP</i>	Disautonomija
		<i>TECPR2</i>	Disautonomija
		<i>DST</i>	Letali, disautonomija
		<i>NTRK1</i>	Įgimtas nejautrumas skausmui ir anhidrozė
		<i>SCN9A</i>	Įgimtas nejautrumas skausmui
		<i>PRDM12</i>	Įgimtas nejautrumas skausmui
		<i>NGF</i>	Įgimtas nejautrumas skausmui
		<i>CLTCL1</i>	Įgimtas nejautrumas skausmui
		<i>CCT5</i>	Neuropatija, akromutiliacija, spastiškumas

Daugeliu tyrimų nustatyta, kad apie 90 proc. pacientų, kuriems genetiniais tyrimais patvirtinta CMT diagnozė, patogeniniai variantai identifikuoti viename iš šių keturių genų: *PMP22*, *GJB1*, *MPZ* ir *MFN2* arba *GDAP1*, priklausomai nuo geografinės vietovės. Pirmasis yra dažnesnis Šiaurės Amerikoje ir Šiaurės Europoje (Foley et al., 2012; Milley et al., 2018; Rudnik-Schoneborn et al., 2016; Sivera et al., 2013), o paskutinis – Viduržemio jūros regione (Gess et al., 2013; Manganelli et al., 2014). Pagrindinių genų *PMP22*, *GJB1*, *MPZ* ir *MFN2* arba *GDAP1* pasiskirstymas pateiktas 3 lentelėje.

**3 lentelė.** CMT genetinių priežasčių pasiskirstymas skirtingų šalių pacientų grupėse

	<b>F. Manganelli ir bendraaut. n = 197</b>	<b>B. Gess ir bendraaut. n = 776</b>	<b>G. M. Milley ir bendraaut. n = 531</b>
Šalis	Italija	Vokietija	Vengrija
Genai			
<i>PMP22</i> del/dup	72,3 proc.	69,9 proc.	40,1 proc.
<i>GJB1</i>	9,5 proc.	13,8 proc.	9,6 proc.
<i>MPZ</i>	4,7 proc.	6,1 proc.	4,5 proc.
<i>MFN2</i>	1,3 proc.	3,5 proc.	2,4 proc.
<i>GDAP1</i>	5,4 proc.	–	–

*Paaiškinimas:* procentai ir skaičiai nurodo atitinkamą dažnį ir bendrą pacientų skaičių tirtoje grupėje.

### 1.5. Paveldima neuropatija su polinkiu į suspaudimo paralyžius (PNSP)

PNSP yra AD būdu paveldimas sutrikimas, kuris yra alelinis CMT1A. PNSP dažniausiai pasireiškia pasikartojančiomis neskausmingomis neuropatijomis suspaudimo vietose (pvz., vidurinio nervo neuropatija riešo srityje, šeivinio nervo neuropatija kelio srityje) (Chua et al., 2006). Židininės neuropatijos išnyksta savaime, nors ilgalaikiai neuropatijos požymiai išlieka. Atsitiktinis suspaudimas (pvz., pasirėmimas alkūne, kelių sukryžiuavimas, atsitūpimas ar padėtis operacijos metu) gali sukelti neuropatijas. Židininės neuropatijos paprastai slepia lengvas, dažnai besimptomes polineuropatijas. PNSP taip pat būdingas polinkis neskausmingoms rankų pleksopatijoms. Kelis kartus buvo aprašyta ūminė PNSP forma, panaši į dauginį mononeuritą ar pleksopatiją (Wedderburn et al., 2014). ENG rodo daugiažidininę demielinizuojančią neuropatiją su ypač sumažėjusiomis motorinėmis ir sensorinėmis distalinėmis latencijomis, tačiau galimi ir aksoninei sensorinei neuropatijai ar mononeuropatijai būdingi požymiai (Spagnoli et al., 2016). Laidumo blokas fiksuojamas tipiškos suspaudimo vietose. Čiurnos nervų biopsija (nors retai reikalinga diagnozei) dažniau rodo židinius mielino sustorėjimus, žinomus kaip toma-kulės (Paprocka et al., 2006). PNSP būdingas nevisiškas penetrantiškumas, kuris paaiškina didelį besimptomųjų asmenų skaičių. Vidutiniškai 80 proc. atvejų lemia 1,5 Mb delecija, apimanti *PMP22* geną (Chrestian et al., 2015). Dėl *PMP22* haplonepakankamumo sumažėja *PMP22* baltymo raiška. O CMT1A priežastis yra to paties DNR segmento duplikacija, kuri lemia padidėjusią *PMP22* baltymo raišką (van Paassen et al., 2014). Nepaisant labai skirtingo paplitimo, manoma, kad šie du molekuliniai pokyčiai atsiranda dėl vienos homologinės nealelinės rekombinacijos įvykio (Pentao et al., 1992). Nepakankama ir mažesnė PNSP penetracija, palyginti su CMT1A, tikriausiai paaiškina šį neatitikimą. Nedidelę dalį tipinių PNSP atvejų sukelia skirtingo dydžio 17p11 srities delecijos arba keletas žinomų *PMP22* geno sekos variantų. Šiais atvejais trūksta 50 proc. funkcinio *PMP22* baltymo, dėl kurio iš tikrųjų pasireiškia haplonepakankamumas ir PNSP fenotipas. Kai kurie *PMP22* patogeniniai variantai taip pat gali lemti klinikinių fenotipų įvairovę, įskaitant lengvą į PNSP panašų CMT1 arba sunkius *Dejerine–Sottas* fenotipus, dar vadinamus CMT1E.

## 1.6. Mitochondrijų disfunkcija ir vaidmuo neuropatijų patogenezėje

Neuropatija dažnai pasireiškia pacientams, sergantiems mitochondrinėmis ligomis, vidutiniškai 12–45 proc. Vaikams PN dažnai netiriama arba neatpažįstama dėl dominuojančių CNS simptomų, tačiau pasireiškia dažnai (Colomer et al., 2000). Mitochondrinės neuropatijos heterogeninės klinikiniu, elektrofiziologiniu ir histopatologiniu požiūriu. Polineuropatija pasireiškia kaip vienas daugiasistemės ligos požymis keliuose mitochondrinuose sindromuose: MELAS, MERFF, LHON, KSS, *Leigh* sindromas, MNGIE, SANDO, MIRAS, MEMSA, AHS (Luigetti et al., 2016; Mancuso et al., 2016). NLG tyrimas dažniausiai parodo aksonines motorines ir sensorines polineuropatijas. Aksoninė motorinė neuropatija yra dominuojantis NARP požymis. Neuropatija gali būti ir nesisteminių mitochondrinų ligų požymis, tuomet dažniausiai pasireiškia asimetrinė aksoninė daugiažidininė neuropatija. Kita vertus, neuropatija gali būti antrinis pagrindinės mitochondrinės ligos požymis veikiant keliems rizikos veiksniams – diabetui, hipotirozei, inkstų nepakankamumui, hipertiroidizmui ir hipoparatiroidizmui. Kadangi kiekviena žmogaus kūno ląstelė turi keletą mitochondrinės DNR (mtDNR) kopijų, mtDNR esantys patogeniniai variantai gali egzistuoti homoplazminės būsenos, kai visos mtDNR molekulės yra arba laukinio tipo, arba mutavusios, arba heteroplazminės būsenos, kai įvairūs kiekiai mutavusios ir laukinio tipo mtDNR gali egzistuoti vienoje ląstelėje. Mitochondrijos aktyviai juda anterogradine ir retrogradine kryptimis išilgai periferinio nervo citoskeleto pagal vietos energijos poreikius. Jų formą, ilgį, skaičių ir dydį kontroliuoja mitochondrijų skilimas ir sintezė, o pusiausvyrą tarp šių dviejų būsenų reguliuoja dinaminiai baltymai. Pakitusios (disfunkcinės) mitochondrijos yra pašalinamos mitofagijos būdu. Ši mitochondrijų dinamika yra labai svarbi energijos poreikiui periferiniuose aksonuose.

Kaip minėta anksčiau, branduolio geno koduojami mitofuzinai reguliuoja mitochondrijų susiliejimą, todėl yra būtini mitochondrijų dinaminiam procesams aksonuose, o *MFN2* geno patogeniniai variantai yra dažniausia CMT2 priežastis. *GDAP1* koduoja baltymą, taip pat dalyvaujantį mitochondrijų judėjime (Niemann et al., 2009; Pareyson et al., 2013).

Neseniai nustatyta, kad *MT-ATP6* geno patogeninis variantas m.9185T>C lemia izoliuotą CMT2 vidutiniškai 1,1 proc. (Pitceathly et al., 2012). Patogeninis variantas m.9185T>C nustatytas homoplazminės būsenos ir beveik visiems asmenims pasireiškė motorinė arba vyraujanti motorinė neuropatija,

kuri prasidėjo pirmame ar antrame gyvenimo dešimtmetyje. Progresuojant ligai jutiminiai nervai taip pat buvo pažeisti. Be PN, kai kuriems pacientams nustatyti mokymosi sutrikimai, neurosensorinis klausos sutrikimas, pigmentinė retinopatija ir *Leigh* sindromą primenantys būklės pablogėjimai persirgus gretutinėmis infekcinėmis ligomis. Patogeniniai variantai *MT-ATP6* gene taip pat lemia NARP ir *Leigh* sindromą. Vidutiniškai 30 proc. pacientų, sergančių *Leigh* sindromu, kuriems nustatyti m.8993T>G ir m.8993T>C patogeniniai variantai *MT-ATP6* gene, pasireiškė PN (Fujii et al., 1998). Šie patogeniniai variantai nustatomi pusei NARP pacientų, o *MT-ATP6* genas yra vienintelis siejamas su šiuo sindromu. Galima daryti prielaidą, kad PN, prasidėjusi pirmame ar antrame gyvenimo dešimtmetyje pacientams, kuriems diagnozuojamas NARP, yra nulemta m.9185T>C, o vaikystėje pasireiškianti PN rečiau nulemta patogeninio varianto m.8993T>C. *MT-ATP6* patogeniniai variantai aprašyti pacientams, kuriems pasireiškė vėlyvos pradžios motorinė neuropatija ir ūmaus silpnumo epizodai, primenantys periodinę paralyžių (Aure et al., 2013).

## 2. DARBO METODOLOGIJA

Mokslinis tyrimas atliktas Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Biomedicinos mokslų instituto Žmogaus ir medicininės genetikos katedroje.

Moksliniam tyrimui atlikti gauti Vilniaus regioninio biomedicininųjų tyrimų etikos komiteto leidimai Nr. 158200-15-771-288 ir Nr. 158200-15-791-303.

### 2.1. Tiriamieji

Šimtas šešiasdešimt trys negiminingi pacientai iš 163 šeimų buvo įtraukti į tyrimą nuo 2012 iki 2017 metų. Pacientai suskirstyti į dvi grupes. Pirmąją grupę sudarė 16 pacientų, kurie atrinkti pagal kriterijus:

1. Mitochondrinių ligų fenotipas, kai pasireiškia dviejų ir daugiau organų sistemų simptomai (pvz., lėtinė progresuojanti išorinė oftalmoplegija, smegenėlių ataksija, traukuliai, miokloninė epilepsija, į insultą panašūs epizodai (išskyrus išeminius tromboembolinės kilmės insultus), proksimalinis silpnumas, fizinio krūvio netoleravimas, kardiomiopatija, regos nervų atrofija, pigmentinė retinopatija, abipusis neurosensorinis klausos sutrikimas, polineuropatija) remiantis klinikiniais kriterijais, pateiktais 1 priede.
2. Raudonos netolygios skaidulos ir (ar) citochromo c oksidazei (COX) neišmatuotos skaidulos raumens bioplate.
3. Neuroradiologiniai *Leigh* sindromui būdingi požymiai arba leukoencefalopatija.

Antrąją grupę sudarė 147 pacientai, atrinkti pagal kriterijus:

1. PN fenotipas (periferinė motorinė ir (arba) sensorinė neuropatija), nustatyta ENG tyrimu. Pagal ENG tyrimo rezultatus pacientai buvo priskirti atitinkamam CMT potipiui.
2. Nenustatytos jokios kitos įgytos neuropatijos priežastys (trauminės, toksinės, metabolinės, virusinės ar kt.).
3. Genealogijų duomenys, atitinkantys paveldimą pobūdį.

Šią grupę sudarė 122 pacientai, kuriuos priskyrėme *Charcot–Marie–Tooth* ligos fenotipui (CMT1 (n = 64), CMT2 (n = 37), CMT-T (n = 21)), 22 pacientai, kuriuos priskyrėme PNSP fenotipui (17 pacientų, kuriems kartojojosi paralyžiai ir (arba) jutimų išnykimas, susijęs su tipinėmis nervų suspaudimo vietomis, laidumo blokais ir lengva demielinizuojančio tipo neuropatija, ir

5 pacientai, kuriems nustatyta motorinė neuropatija) ir 3 maži vaikai, kuriems pasireiškė neuroraumeninės ligos fenotipas ir dominuojantys neuropatijos požymiai. Daugumai pacientų klinikinis neurologinis tyrimas, ENG ir neuroradiologiniai tyrimai atlikti VŠĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Neurologijos centre ir Vaikų ligoninėje, VŠĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų filiale. Penkiems pacientams, kuriems įtarta pirminė mitochondrinė liga, atliktas raumens biopsijos tyrimas Valstybiniame patologijos centre, VŠĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų filiale. Išsamūs genealogijų duomenys buvo renkami iš visų pacientų, siekiant nustatyti sergančius asmenis šeimose arba tuos, kuriems yra rizika sirgti mitochondrine liga.

## 2.2. Tyrimo eiga

### *Kohortinis retrospektyvinis tyrimas*

Į tyrimą įtraukti 37 antrosios grupės pacientai, kuriems 2012–2017 m. Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Medicininės genetikos centre nustatyta CMT1A genomines srities duplikacija, ir šeši pacientai, kuriems nustatyta CMT1A genomines srities delecija. Buvo peržiūrėta pacientų medicininė dokumentacija (ambulatorinės kortelės), įskaitant demografinius duomenis, ligos anamnezę, genealogijų duomenis, laboratorinių ir elektrofiziologinių tyrimų rezultatus. Jokių papildomų tyrimų nebuvo atliekama.

### *Kohortinis perspektyvinis tyrimas*

Visi kiti šiame darbe atlikti tyrimai buvo atlikti perspektyviai. Genetiniai tyrimai atlikti kaip diagnostinis algoritmas, o jų rezultatai perduoti pacientus siuntusiems gydytojams ir naudojami ilgalaikiai pacientų stebėsenai. Šioje disertacijoje atlikti genetiniai tyrimai turi bendrą metodologinę darbo eigą, paremtą genetinių duomenų generavimu, jų analize ir interpretacija bei nustatytų pokyčių patvirtinimu (žr. 16 lentelę).

## 2.3. Branduolio genų ir mtDNR Sangerio sekoskaita

### 2.3.1. DNR išskyrimas

Genetiniai tyrimai buvo atlikti, tiriant genomine DNR, išskirtą iš periferinio kraujo ląstelių. Pacientams, kuriems nustatyti mtDNR patogeniniai variantai, genetiniai tyrimai taip pat atlikti tiriant genomine DNR, išskirtą iš

šlapimo nuosėdų ląstelių. DNR buvo išskirta Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Medicininės genetikos centro darbuotojų fenolio ir chloroformo išskyrimo metodu pagal patvirtintą diagnostikos protokolą „DNR išskyrimas fenolio ir chloroformo metodu“ (generalinio direktoriaus įsakymas Nr. 461). DNR koncentracija ir švarumas buvo nustatoma spektrofotometru *NanoDrop®* pagal gamintojo pateiktą vartotojo vadovą *NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer User Manual*.

### 2.3.2. Oligonukleotidinių pradmenų sukūrimas

Genominės DNR sekos buvo gautos iš „Ensembl Genome Browser“ (2017 m. gruodžio mėn. rinkinių) duomenų bazės. Oligonukleotidiniai pradmenys: tiesioginis (T) ir atvirkštinis (A), (toliau – pradmenys) buvo sukurti, naudojant internetinę „Primer3“ programinę įrangą (versija 0.4.0, prieinama <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), ir susintetinti *Metabion International AG* (<http://www.metabion.com/>).

*In silico* PGR ir BLAST analizė buvo atlikta *UCSC Genome Browser* (<https://genome.ucsc.edu/>) / (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>), siekiant užtikrinti, kad pradmenys būtų komplementarūs konkrečiai geno sričiai. MtDNR sekoskaitai pradmenų sekos buvo sukurtos taip, kad būtų galima nusekvenuoti visą mitochondrijų genomą persidengiančiais segmentais.

### 2.3.3. Ilga PGR

Šiuo metodu pagausinama beveik visa mtDNR seka. Pradmenys dažniausiai parenkami šalia D kilpos ir gaunamas 14–16 kb PGR produktas. Jeigu yra įvykusi delecija arba duplikacija, tuomet atitinkamai pakinta ir fragmento ilgis. Ilgos PGR metodas gali būti pirmojo pasirinkimo, nes juo įvertinama, ar yra mtDNR delecija ir (ar) duplikacija. Reakcija buvo vykdoma 25 µl tūryje, mišinio sudėtis nurodyta 4 lentelėje, o etapai – 5 lentelėje.

**4 lentelė.** Ilgos PGR reakcijos mišinio sudėtis

Reagentas	Tūris; µL; 1 reakcija
Vanduo	16,25
dNTP Mix 10 mM ( <i>Thermo Fisher Scientific</i> )	0,5
5xGC buferis ( <i>Thermo Fisher Scientific</i> )	5
Tiesioginis pradmuo	1
Atvirkštinis pradmuo	1
<i>Phusion hot start II high-fidelity</i> DNR polimerazė ( <i>Thermo Fisher Scientific</i> )	0,25
DNR (50 µg/µl)	1



**5 lentelė.** Ilgos PGR etapai

Ilgos PGR etapai		Temperatūra, °C	Trukmė, min:s
1.	Pradinis denatūravimas	98	3:00
2.	Denatūravimas	98	00:20
3.	Pradmenų prijungimas	64	00:45
4.	DNR sintezė	72	10:00
5.	Galinė DNR sintezė	72	10:00
6.	Mėginių laikymas	4	∞

#### 2.3.4. PGR

PGR yra metodas, taikomas selektyviai ir eksponentiškai pagausinti specifinėms DNR sekoms *in vitro* iki  $10^9$  kartų. Reakcijai reikalingi pasikartojantys temperatūros ciklai, buferinis tirpalas, tiesioginiai ir atvirkštiniai pradmenys, deoksiribonukleotidai (dNTP: dGTP, dCTP, dATP, dTTP), magnio chloridas ( $MgCl_2$ ), Taq polimerazė (*Thermo Fisher Scientific*) ir DNR. Jei reikia, įdedama 10 proc. tirpalo tūrio dimetilsulfoksido (DMSO). Pradmenys sukuriama pagal anksčiau aprašytus reikalavimus, gaunami kaip kietos sausos granulės, kurios praskiedžiamos iki 100 pM/μl pradinio tirpalo, ir laikomi  $-20$  °C temperatūroje. Tyrimams saugomų pradmenų tirpalas skiedžiamas iki 5–10 pM/μl koncentracijos ir naudojamas PGR. Kiekvienam pradmenų porų rinkiniui pagrindinis reakcijos mišinys yra sudaromas iš visų reakcijos komponentų, išskyrus DNR. Tyrimui ruošiamo mišinio tūris priklauso nuo reikalingų reakcijų skaičiaus. Tuomet vykdomi PGR mišinio su tiriamojo DNR keliasdešimt pasikartojančių kaitinimo ir aušinimo ciklų, kad būtų atskirtos DNR grandinės (denatūracija), prijungiamos pradmenų poros prie joms komplementarių DNR sekų (prisijungimas) ir atliekama dominančios srities fermentinė sintezė (DNR pailgėjimas). PGR buvo atlikta „Eppendorf“ 96 šulinėlių „Mastercycler“ termocikleryje. Naudotas PGR protokolas, kuris padeda išvengti kitų nedominančių sričių pagausinimo, gerinant pradmenų prisijungimo specifiskumą. PGR metu buvo atliekama neigiama (vandens) kontrolė siekiant užtikrinti, kad reakcijos metu būtų pagausinama norima DNR ir nė viena iš reakcijos sudedamųjų dalių nėra užteršta svetima DNR. Branduolio DNR koduojamų genų PGR mišinių sudėtis pateikta 6 lentelėje, o PGR etapai – 7 lentelėje. MtDNR PGR mišinio sudėtis pateikta 8 lentelėje, o PGR etapai – 9 lentelėje.

**6 lentelė.** Branduolio DNR koduojamų genų PGR mišinys

PGR mišinys	Tūris; µL; 1 reakcija
<b><i>GJB1</i></b>	
Vanduo	7,5
<i>PCR MasterMix</i> (2×)	12,5
Pradmuo (T+A)	2 (1+1)
DNR (~500ng/ul)	1
<b><i>MPZ, MFN2 (išsk. 10–11, 19 egzonas), PMP22 (išsk. 2 egzoną)</i></b>	
Vanduo	9,5
<i>PCR MasterMix</i> (2×)	12,5
Pradmuo (T+A)	2
DNR (~500ng/ul)	1
<b><i>MFN2 (10–11, 19 egzonai), PMP22 (2 egzonas)</i></b>	
Vanduo	7,5
<i>PCR MasterMix</i> (2×)	12,5
Pradmuo (T+A)	2
DMSO	2
DNR (~500ng/ul)	1

**7 lentelė.** PGR sąlygos, reikalingos branduolio DNR koduojamų genų gausinimui

PGR etapai		Temperatūra, °C	Trukmė, min:s
1.	Pradinis denatūravimas	94	5:00
2.	Denatūravimas	94	1:00
3.	Pradmenų prijungimas	58	1:00
4.	DNR sintezė	72	1:00
5.	Galutinė DNR sintezė	72	8:00
6.	Mėginių laikymas	4	∞

**8 lentelė.** PGR sąlygos, reikalingos mtDNR gausinimui

PGR etapai		Temperatūra, °C	Trukmė, min:s
1.	Pradinis denatūravimas	98	3:00
2.	Denatūravimas	98	00:30
3.	Pradmenų prijungimas	64	00:30
4.	DNR sintezė	72	2:00
5.	Galutinė DNR sintezė	72	7:00
6.	Mėginių laikymas	4	∞

**9 lentelė.** mtDNR PGR mišinys

PGR mišinys		Tūris; $\mu\text{L}$ ; 1 reakcija
1.	Vanduo	20,1
2.	dNTP (10mM)	0,6
3.	5x HF buferis	6
4.	Pradmuo (T+A)	2 (1+1)
5.	PhusionHSII	0,3
6.	DNR (~500ng/ul)	1

### 2.3.5. Elektroforezė agarozės gelyje ir PGR produktų valymas

Elektroforezė agarozės gelyje – tai metodas, naudojantis elektros srovę atskirti DNR molekules pagal jų ilgį. Gelis formuoja matricą, per kurią mažesnės DNR molekulės juda greičiau nei didesnės molekulės. Šis metodas buvo taikomas vizualizuoti PGR produktams, siekiant įvertinti, ar PGR produktas pagausintas ir ar yra reikiamo ilgio ir specifiškumo. PGR produktai buvo leidžiami 1,5 proc. agarozės gelyje horizontalios elektroforezės aparate su įvedimo dažų etidžio bromidu arba *SybrSafeDNA* (*Thermo Scientific*). Kaip kontrolė buvo leidžiamas DNR molekulinio ilgio standartas 100 bp *DNA Ladder* (*Thermo Scientific*). Elektroforezė vykdyta esant 110–130 V įtampai apie ~30 min. Pasibaigus elektroforezei, gelis vizualizuotas ultravioletinėje šviesoje (302 nm), UV transiluminatoriuje (*Herolab E.A.S.Y*). Gelis analizuotas „*EasyWin*“ gelių analizavimo sistema. Jei PGR produktas buvo to paties ilgio kaip apskaičiuotas PGR produkto ilgis ir PGR metu negauta kito ilgio nespecifinių DNR fragmentų, PGR produktas buvo išvalytas nuo nepanaudotų pradmenų ir nukleotidų naudojant egzonukleazę *ExoI* ir krevečių šarminę fosfatazę SAP pagal laboratorijoje patvirtintą protokolą (žr. 10 lentelę).

**10 lentelė.** *ExoI-SAP* mišinys, skirtas vienam PGR produktui gryninti

<i>ExoI-SAP</i> mišinys	Tūris; $\mu\text{L}$
TE buferis (Tris-EDTA; pH = 8,0)	1,8
<i>SAP</i> (angl. <i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i> ) fosfatazė (1 U/ $\mu\text{L}$ )	0,14
<i>ExoI</i> (angl. <i>Exonuclease I</i> ) egzonukleazė I (20 U/ $\mu\text{L}$ )	0,06
Bendras mišinio tūris ( $\mu\text{L}$ )	2,0

### 2.3.6. Sekoskaitos reakcija

Išgrynintiems PGR produktams buvo atlikta sekoskaitos reakcija, naudojant sekoskaitos reakcijos rinkinį *BigDye® Terminator v3.1* (ABI PRISM®, *Applied Biosystems*). Kiekvienam PGR produktui buvo atliekamos dvi sekoskaitos reakcijos naudojant tiesioginį ir atvirkštinį sekoskaitos pradmenis. Kiekvienai tiriamai genomo sričiai buvo sukurtas pagrindinis reakcijos mišinys. Branduolio DNR koduojamų genų sekoskaitos PGR mišinių sudėtis pateikta 11 lentelėje, o sekoskaitos PGR etapai – 12 lentelėje. MtDNR sekoskaitos PGR mišinio sudėtis pateikta 13 lentelėje, o sekoskaitos PGR etapai – 14 lentelėje.

**11 lentelė.** Branduolio DNR koduojamų genų sekoskaitos PGR mišinys

PGR mišinys	Tūris; µL; 1 reakcija
<b>GJB1, MFN2, MPZ, PMP22</b>	
Vanduo	2,4
5× sekoskaitos buferis	1,4
Terminacijos mišinys ( <i>BigDye Terminator v3.1</i> )	1,0
Pradmuo (T arba A) 10 pmol/µL	0,2
Exo-I-SAP produktas	2

**12 lentelė.** Branduolio DNR koduojamų genų sekoskaitos PGR sąlygos

Sekoskaitos reakcijos etapai	Temperatūra, °C	Trukmė, min:s
Pradinis denatūravimas	96	01:00
Denatūravimas	96	00:16
Pradmenų prijungimas	52	00:16
Pradmenų pratęsimas / DNR sintezė	60	04:00
Papildoma sintezė	60	08:00
Mėginių laikymas	4	∞

**13 lentelė.** mtDNR sekoskaitos PGR mišinys

PGR mišinys	Tūris; µL; 1 reakcija
Vanduo	2,3
BDTv3	0,3
5x BDT buferis	1,4
Pradmuo (T+A)	1
Exo-I-SAP produktas	2

**14 lentelė.** mtDNR sekoskaitos PGR sąlygos

Sekoskaitos reakcijos etapai	Temperatūra, °C	Trukmė, min:s
Pradinis denatūravimas	96	01:00
Denatūravimas	96	00:10
Pradmenų prijungimas	56	00:05
Pradmenų pratęsimas / DNR sintezė	60	04:00
Mėginių laikymas	4	∞

### 2.3.7. Sekoskaitos reakcijos produktų gryninimas ir tiesioginės nukleotidų sekos nustatymas Sangerio sekoskaita

Norint paruošti mėginius automatizuotam DNR sekos nustatymui, jie pirmiausia turi būti išgryninti nuo nepanaudotų dNTP ir ddNTP po sekoskaitos PGR. Sekoskaitos reakcijos produktų gryninimas buvo atliktas taikant etanolio precipitacijos metodą su etanoliumi ir natrio acetatu. Tuomet atlikta tiesioginės nukleotidų sekos nustatymo reakcija frakcionuojant automatizuotos kapiliarinės elektroforezės metodu *3130xl Genetic Analyzer* prietaisu. Elektroforezės eigai naudojama *3130xl Data Collection v3.0* kompiuterinė programa. Elektroforegramai analizuoti naudojama *Sequencing analysis 5.2* kompiuterinė programa. Branduolio DNR sekos buvo palygintos su referentine seka *hg19*, pateikta [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org) duomenų bazėje.

MtDNR sekos buvo palygintos su peržiūrėta Kembridžo referentine seka (GenBank: NC\_012920) (Andrews et al., 1999) ir nustatyti variantai palyginti su mtDNR variantais, pateiktais *Mitomap* duomenų bazėje <http://www.mitomap.org> (Lott et al., 2013). Variantai buvo laikomi retais, jei jie nustatomi  $\leq 10$  kartų *Mitomap* duomenų bazėje tarp 32 059 mtDNR sekų.

### 2.4. Naujos kartos sekoskaita

Tikslinė NKS atlikta 34 pacientams, naudojant 150 su CMT susijusių genų, atrinktų atlikus literatūros analizę ir duomenų bazių paiešką, rinkinį (IPNMDB, OMIM, Gene Reviews, PubMed, HGMD (Stenson et al., 2014) (žr. 2 priedą).

*Ion Torrent* technologija yra apibūdinama kaip vieno nukleotido papildymo metodas, nes kiekvienas iš keturių nukleotidų yra pridedamas pasikartojamai. Nors ši technologija nėra paremta optiniu aptikimu, tačiau joje naudojamas puslaidininkinis įtaisas, kuris nustato pH pokyčius, atsiradusius dėl H<sup>+</sup> jonų

išsiskyrimo, kai įjungiamas dNTP. Homopolimerinėse sekose ciklo metu gali būti įterpta daug dNTP (Goodwin, McPherson, McCombie, 2016). pH pokytis bus didesnis, tačiau tikslumas, kuriuo nustatomas dNTP skaičius, sumažėja kartu su homopolimero ilgiu, todėl ši technologija pasižymi specifinėmis klaidomis. Dalis genomo sričių nėra tiriamos, todėl negali būti vertinamos, be to, gali būti didelis skaičius klaidingai teigiamų rezultatų dėl per mažo padengimo. Tyrimui pradinė DNR kokybė buvo nustatyta naudojant spektrofotometrą *Nano-Drop*®. Sekoskaitos bibliotekos paruošimas buvo atliekamas naudojant 10 ng genominę DNR ir naudojant *Ion AmpliSeq Library Kit 2.0* (*Life Technologies, Inc.*) tiriamų fragmentų bibliotekai pagausinti (*Proflex* termocikleris, *Thermo Fisher Scientific*, JAV). Tada atliktas bibliotekos dalinis pradmenų skaidymas ir buvo prijungti bendros sekos nustatymo adapteriai ir unikalios sekos oligonukleotidiniai brūkšniniai kodai („Ion Xpress“ oligonukleotidinių brūkšnių kodų adapterių 1–16 komplektas, *Life Technologies, Inc.*). Atlikus gryninimą magnetinėmis dalelėmis, padengtomis polietilenglikoliu (*Agencourt*® *AMPure*® *XP Reagent* (*Beckman Coulter, Inc.*)), bibliotekos buvo kiekybiškai įvertintos naudojant *Ion Library Quantification Kit* (*Applied Biosystems, Life technologies*) ir praskiestos iki galutinės 8 pM koncentracijos. Praskiestos bibliotekos buvo sujungtos ir toliau gausinamos emulsine PGR. Atlikus emulsinės PGR surinktų sferinių jonų dalelių su genomines DNR bibliotekomis praturtinimą, prijungiami sekoskaitos pradmenys ir polimerazė, paruošiamas Ion 318™ Chip lustas (*Life Technologies, Corp.*) ir sekvenuojama „Ion Torrent™ Personal Genome Machine™ (PGM)“ (*Life Technologies Holdings Pte Ltd*) sistema. Pirminė sekoskaitos metu gautų duomenų kokybė, kartografavimas, padengimo analizė ir gautų variantų suvestinė atlikta naudojant genomo analizės *Ion Torrent Suite™ Software* (versijos 4.0.2 ir 4.0.3, *Life Technologies Holdings Pte Ltd*) programinę įrangą *Ion Torrent™ Server* duomenų saugykloje. Sekos fragmentų lygiavimas su žmogaus genomo referentine seka atliktas naudojant TMAP programinę įrangą. *Ion Torrent Variant Caller* (versija 4.2.0) buvo naudojama režimu „Germline – low stringency“ su numatytais parametrais. Vidutinis sekos padengimas buvo  $168,13 \pm 61,32$  kartų daugiau nei 99 proc. tikslinių genomo sričių. Buvo išanalizuoti visi tikslinio rinkinio genai. Gauti NKS duomenys buvo vizualizuojami naudojant integruotą genomo peržiūros programinį įrankį (angl. *Integrative Genomics Viewer*) <http://software.broadinstitute.org/software/igv/>.

Antrinė rezultatų analizė, gavus genetinių variantų sąrašą, buvo anotacija. „Variant Effector Prediction“ (VEP) programinė įranga (McLaren et al., 2016) nustato variantų poveikį genams, transkriptams, baltymų sekoms ir reguliaci-

nėms sritims pagal tam tikrą variantų informaciją, pvz., ar variantas patenka į tokius didelius duomenų rinkinius kaip *1000G* („The 1000 Genomes Project Consortium, 2015“) ir *ExAC* (Karczewski et al., 2017), varianto vieta (pvz., egzoninis / introninis arba *missense* / sinoniminis ir t. t.) ir kt. Anotacija atlikta laisvos prieigos *Cywin*, *ANNOVAR*, *Perl* programomis.

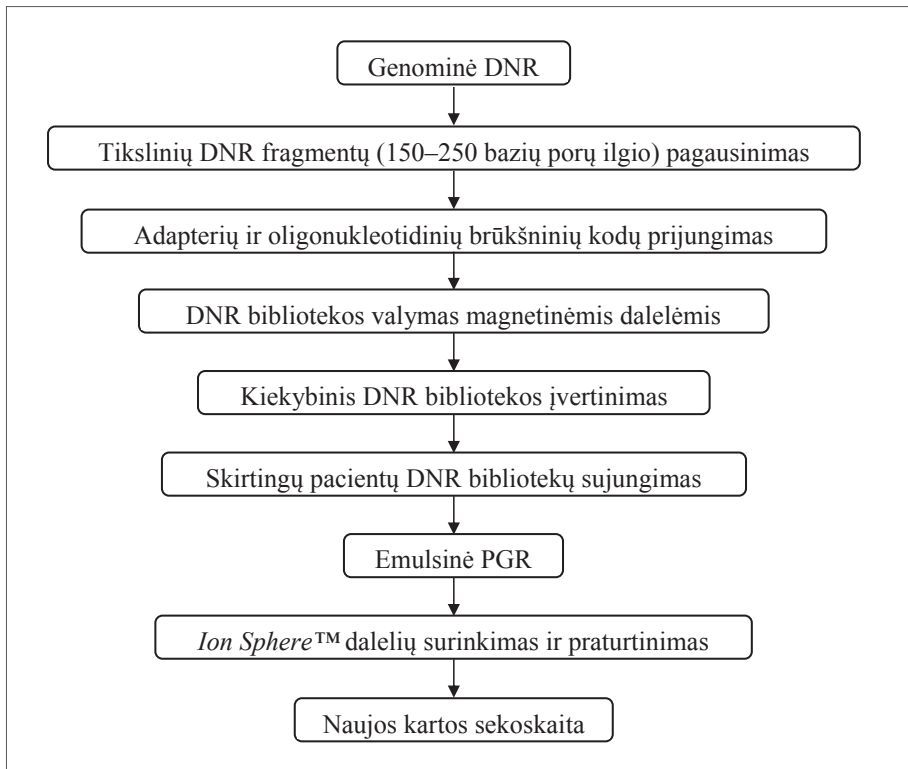
Bet kokių, NKS technologija identifikuotų kandidatų variantų patogeniškumo analizė buvo patikrinta naudojant *in silico* patogeniškumo įverčių internetinę programinę įrangą *PolyPhen-2* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), *PROVEAN* ir *SIFT* ([http://provean.jcvi.org/genome\\_submit\\_2.php](http://provean.jcvi.org/genome_submit_2.php)), *Mutation Taster* (<http://www.mutationtaster.org/>), *VEP* ([http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Tools/VEP](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Tools/VEP)) ir *TMHMM* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) (žr. 15 lentelę). *NNSPLICE 0.9* buvo naudota prognozuojant splaisingo variantų poveikį.

**15 lentelė.** *In silico* prognostiniai įverčiai, palengvinantys varianto patogeniškumo interpretaciją

<i>In silico</i> įrankis	Patogeniškumo slenkstis <sup>a</sup>
<i>SIFT</i>	> 0,95
<i>Polyphen-2</i>	> 0,5
<i>Mutation Taster</i>	> 0,5
	Konservatyvumo slenkstis <sup>b</sup>
<i>GERP</i>	> 2

<sup>a</sup>Vertės pagal Li ir bendraut. (Li et al., 2014; cit. iš. Grimm et al., 2015); <sup>b</sup>Patvirtinta vertė pagal Nacionalinį sveikatos institutą (NIH; <http://www.nih.gov/>).

Buvo išanalizuoti visi reti nesinominiai koduojančiose srityse nustatyti sekos variantai. Reti variantai yra apibrėžiami kaip tie, kurių alternatyvaus alelio dažnis yra mažesnis nei 1 proc. duomenų bazėse *Exome Variant Server* (EVS; <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) ir *1000 Genomes* projekte (<http://www.1000genomes.org/>). Įtariamą ligos paveldėjimo modelis kiekvienam pacientui palengvino dominantinių (heterozigotinių) arba recesyvių (homozigotinių, sudėtinių heterozigotinių) alelių nustatymą. Pagrindinių NKS etapų santrauka pateikta 3 paveiksle.



**3 pav.** Sekoskaitos DNR bibliotekos paruošimas Ion Torrent™ PGM sistema

## 2.5. Viso egzomo sekoskaita

Viso egzomo sekoskaita (VES) atlikta 6 pacientams bendradarbiaujant su kolegomis Vokietijoje ir Japonijoje. Tikslinis kiekvieno DNR mėginio gausinimas buvo atliktas naudojant *Agilent SureSelect 50Mb (V5) All ExonKit* rinkinį. Sekoskaitos (*Illumina HiSeq 2000* sistema) metu gauta vidutiniškai 6 Gb iš 100 bp abiem kryptimis suporuotas fragmentų skaičius viename mėginyje. Sulygiuotų fragmentų skaičius, variantų suvestinė (vieno nukleotido variantai ir intarpai / delecijos) ir anotacija buvo atlikta, kaip aprašyta anksčiau (Wang, Li, Hakonarson, 2010). Vidutinis sekos padengimas buvo 80–120 kartų. Kiekviename mėginyje buvo > 95 proc. bazių koduojančiose sekose, kurios padengtos mažiausiai 20 kartų. Išnagrinėti visi reti ir nesinoniminiai reti variantai koduojančiose srityse. Reti variantai apibrėžiami kaip tie, kurių alternatyvaus alelio dažnis mažesnis nei 1 proc. duomenų bazėse *Exome Variant Server* (EVS; <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) ir *1000 Genomes* projekte (<http://www.1000genomes.org/>). Kiekvieno paciento įtariamas ligos paveldėjimo



modelis palengvino dominantinių (heterozigotinių) arba recesyvių (homozigotinių, sudėtinių heterozigotinių) alelių nustatymą. Heterozigotiniai variantai AD genealogijose taip pat buvo prioritizuoti, jei nustatomi > 5 kartus *ExAC* duomenų bazėje. Statistiniai vertinimai, tokie kaip *GERP* balai, buvo naudojami konservatyvumui įvertinti, o *SIFT*, *Polyphen2* ir *Mutation Taster* pateikė nustatytų variantų patogeniškumo prognozę.

## 2.6. Nustatytų genetinių pokyčių patvirtinimas

Genetiniams pokyčiams patvirtinti gali būti taikomi įvairūs metodai. Galimai ligą lėmusio varianto segregacijos tyrimas tarp šeimos narių yra svarbus siekiant patvirtinti varianto segregaciją su liga, taip pat ir paveldėjimo modelį šeimoje. Šiame darbe segregacijos tyrimai šeimose, kiek įmanoma, buvo atlikti didesnei daliai pacientų. Kiekvienam galimai ligą lemiančiam nustatytam variantui buvo atlikta Sangerio sekoskaita pagal anksčiau aprašytas sąlygas.

## 2.7. Statistinė analizė

Duomenų statistinė analizė atlikta naudojant atvirojo kodo programą R, versiją 3.4.3 ir *Microsoft Excel 2016* programą.

Vertinant kiekybinius rodiklius, pavyzdžiui, respondentų amžių, diagnozės nustatymo pradžios amžius buvo apskaičiuojamas taikant aritmetinį vidurkį:  $\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n x_j$ . Taip pat buvo skaičiuojamas standartinis nuokrypis ( $s$ ), kuris parodo atsitiktinio dydžio įgyjamų reikšmių sklaidą apie vidurkį. Jis apskaičiuojamas pagal formulę:  $s = \sqrt{\sum_{j=1}^n (x_j - \bar{x})^2 / (n - 1)}$ .

Hipotezėms apie kintamojo skirstinio normalumą patikrinti buvo naudojamas Šapiro ir Vilko (angl. Shapiro-Wilk) testas bei grafiniai būdai, t. y. histograma ir stačiakampė diagrama.

Dviejų nepriklausomų imčių palyginimui buvo taikomas  $t$  testas arba Mano–Vitno–Vilkoksono rangų sumų kriterijus, atsižvelgiant į duomenų normalumo sąlygą.

Dažnių palyginimui buvo skaičiuojamas ir vertinamas  $\chi^2$  kriterijus. Esant mažam stebėjimų skaičiui arba kai nors vienas tikėtinas stebėjimų skaičius mažiau nei penki, papildomai buvo skaičiuojamas tikslus Fišerio kriterijus.  $\chi^2$  kriterijus parodo, ar empirinio ir teorinio skirstinių skirtumas yra reikšmingas, t. y. tikrinama, ar turimas empirinis skirstinys suderinamas su teoriniu modeliu.  $\chi^2$  kriterijaus reikšmė apskaičiuojama pagal formulę:

$\chi^2 = \sum_{i=1}^k (O_i - E_i)^2 / E_i$ , čia  $O_i$  – nustatyti dažniai,  $E_i$  – tikėtini dažniai.  $k$  – bendras kintamųjų kategorijų ir grupių kaičius, lygus kryžminės lentelės eilučių ir stulpelių sandaugai.

Skirtumai laikyti statistiškai reikšmingais, kai reikšmingumo lygmuo  $p < 0,05$ .

Viso darbo metodologija ir eiga apibendrinta 16 lentelėje.

**16 lentelė.** Tyrimo metodų ir darbo eigos santrauka

<b>Molekuliniai genetiniai metodai – pirminiai duomenys</b>	<b>Genetinių duomenų analizė ir interpretavimas</b>	<b>Molekuliniai genetiniai ir kiti metodai – pirminių duomenų patvirtinimas</b>
CMT1A ir PNSP pacientų analizė	Retrospektyvinis tyrimas Ligos istorijų ir ambulatorinių kortelių įrašai	Fenotipų heterogeniškumo įvertinimas
Doktorantės indėlis 80 proc.		
mtDNR Sangerio sekoskaita, mtDNR delecijų / duplikacijų nustatymas	Perspektyvinis tyrimas Variantų filtravimas naudojant programinę įrangą <i>BioEdit 7.2.6.1</i> ; Variantų interpretacija naudojant MITOMAP	Segregacijos tyrimai; Fenotipų įvertinimas; Kiti diagnostiniai tyrimai (raumens biopsijos histologinis tyrimas, MRT)
Doktorantės indėlis 40 proc.		
<i>MT-ATP6/8</i> genų Sangerio sekoskaita	Perspektyvinis tyrimas Variantų filtravimas naudojant įrankį / programinę įrangą <i>BioEdit 7.2.6.1</i> ; Variantų interpretacija naudojant MITOMAP	Netaikyta
Doktorantės indėlis 80 proc.		
<i>GJB1, MFN2, MPZ, PMP22</i> genų Sangerio sekoskaita	Perspektyvinis tyrimas Genotipo ir fenotipo koreliacija	Segregacijos tyrimai; Fenotipų įvertinimas; Kiti diagnostiniai tyrimai
Doktorantės indėlis 80 proc.		
Tikslinio 150 genų rinkinio tyrimas naujos kartos sekoskaitos technologija	Perspektyvinis tyrimas NKS variantų analizė naudojant integruotą genomo peržiūros programinį įrankį. Variantų filtravimas (reti variantai < 1 proc.)	Segregacijos tyrimai; Sangerio sekoskaita; Fenotipų įvertinimas
Doktorantės indėlis 40 proc.		
Viso egzomo sekoskaita naujos kartos sekoskaitos technologija	Perspektyvinis tyrimas Variantų analizė atlikta naudojant programinę įrangą <i>Alamut Visual software v.2.7.2</i>	Segregacijos tyrimai; Sangerio sekoskaita; Fenotipų įvertinimas
Doktorantės indėlis 30 proc.		

### 3. TYRIMŲ REZULTATAI IR APTARIMAS

#### 3.1. Kohortinio retrospektyvinio tyrimo rezultatai

##### 3.1.1. Pacientų, kuriems diagnozuotas CMT1A potipis, fenotipų įvertinimas

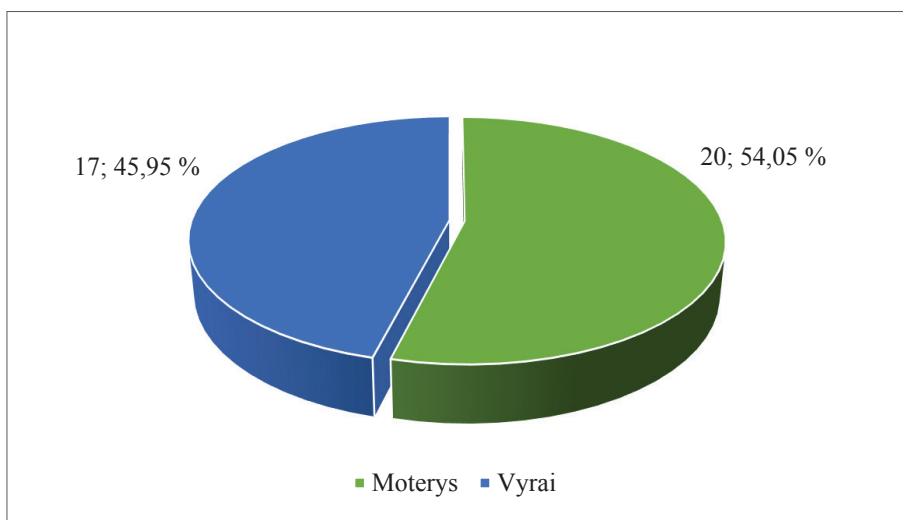
CMT1A potipis nustatytas 38 pacientams ( $n = 122$ ). Vienas iš jų šiame tyrime nedalyvavo, todėl imties dydį sudarė 37 pacientai. Vidutinis pacientų amžius, kai pasireiškė pirmieji simptomai, buvo  $9,08 \pm 8,37$  metų, o vidutinis amžius, kai diagnozuotas CMT1A potipis, buvo  $28,10 \pm 17,82$  metų.

Dažniausius pirmuosius simptomus pacientai ir (ar) jų tėvai siejo su kojomis. Tai pasireiškė sunkumu bėgti, šokinėti, lipti laiptais, nerangia eisena. Jiems taip pat dažnai kliuvo kojos einant. Pėdų deformacija kaip pirmasis požymis pasireiškė tik vienam pacientui (2,70 proc.). Raumenų silpnumas ir atrofija distalinėse kojų dalyse bei šlepsinti eisena buvo dažniausi požymiai progresuojant ligai.

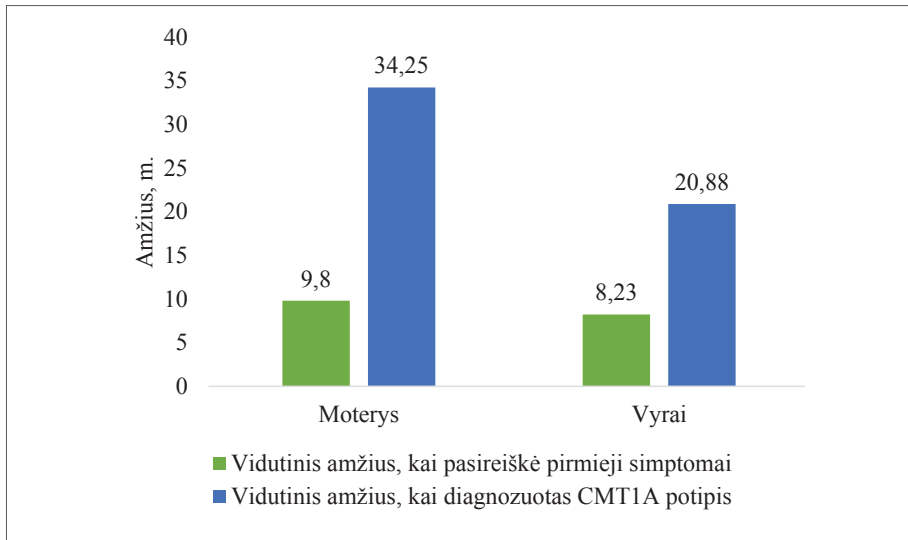
CMT1A diagnozės patvirtinimo metu raumenų mėšlungis ir nuovargis pasireiškė 2 (5,41 proc.) pacientams. Bėgti negalėjo 16 (43,24 proc.) pacientų, o sunkiai, tačiau be pagalbos, vaikščiojo 18 (48,65 proc.) pacientų. Vienas (2,70 proc.) pacientas vaikščiojo pasiremdamas lazda. Klinikinis neurologinis tyrimas parodė, kad raumenų silpnumas apatinėse galūnėse pasireiškė 29 (78,38 proc.) pacientams. Statistiškai reikšmingas skirtumas nustatytas tarp viršutinių ir apatinių galūnių raumenų silpnumo ( $p < 0,001$ ). Raumenų atrofija distalinėse apatinių galūnių dalyse nustatyta 24 (64,86 proc.) pacientams. Jutimo sutrikimus rankose nurodė 22 (59,46 proc.) pacientai, o kojose – visi pacientai. Ryškesnis vibracijos jutimo sutrikimas apatinėse galūnėse nustatytas 20 (54,05 proc.) pacientų. Dažniausiai buvo sutrikęs vibracijos jutimas viršutinėse ir apatinėse galūnėse. Objektyvių jutimo sutrikimų rankose nenustatyta 28 (75,68 proc.) pacientams. Apatinėse galūnėse objektyvių jutimo sutrikimų nenurodė 14 (37,84 proc.) pacientų. Statistiškai reikšmingas skirtumas nustatytas tik tarp jutimo sutrikimų viršutinėse ir apatinėse galūnėse ( $p < 0,002$ ). Sausgyslių refleksų pokyčiai rankose nustatyti 22 (59,46 proc.) pacientams. Susilpnėję sausgyslių refleksai rankose nustatyti 15 (40,54 proc.) pacientų, o šių refleksų atsakų negauta 7 (18,92 proc.) pacientams. Sausgyslių refleksų atsakų dažniau negauta kojose (31 pacientas (83,78 proc.)) negu rankose (7 pacientai (18,92 proc.)) ir šis skirtumas yra statistiškai reikšmingas ( $p < 0,001$ ). Nustatytas statistiškai reikšmingas skirtumas tarp pacientų, kurie

negalėjo eiti pasistiebę (19 pacientų (51,35 proc.)), ir tarp tų, kurie negalėjo eiti ant kulnų (34 pacientai (91,89 proc.)) ( $p < 0,001$ ). Pėdų deformacija – dar vienas vyraujantis požymis, nustatytas 34 (91,89 proc.) pacientams. 33 pacientai (89,19 proc.), kurie negalėjo eiti ant kulnų ir kuriems buvo nustatyta pėdų deformacija (4 pacientai (10,81 proc.)), reikšmingai skyrėsi nuo pacientų, kuriems pėdų deformacija nenustatyta ir kurie galėjo eiti ant kulnų ( $p < 0,001$ ). Nenustatyta reikšminga priklausomybė tarp pacientų, kuriems buvo pėdų deformacija ir kurie negalėjo eiti pasistiebę, ir tarp pacientų, kuriems nenustatyta pėdų deformacija ir kurie galėjo eiti pasistiebę.

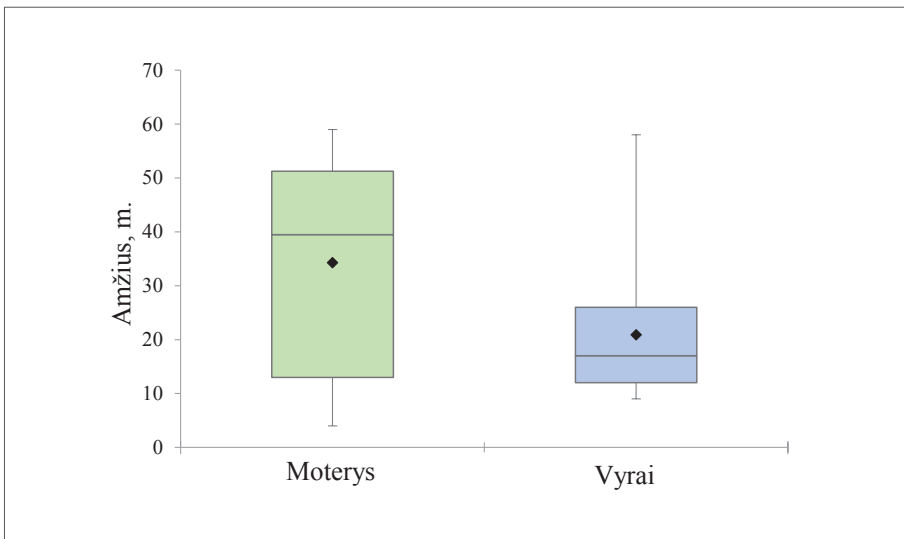
Iš 37 CMT1A sergančių pacientų 20 (54,05 proc.) buvo moterų ir 17 (45,95 proc.) vyrų (žr. 4 pav.). Vidutinis moterų amžius, kai pasireiškė pirmieji neuropatijos simptomai, buvo  $9,80 \pm 9,27$ , o vyrų  $8,23 \pm 7,36$  metų. Vidutinis moterų amžius, kai molekuliniais genetiniais tyrimais patvirtinta CMT1A diagnozė, buvo  $34,25 \pm 19,60$  metų, o vyrų  $20,88 \pm 12,47$  metų (žr. 5 pav.). Moterų ir vyrų amžiaus charakteristikos, kai buvo patvirtinta CMT1A diagnozė, pateiktos 6 paveiksle.



4 pav. Moterų ir vyrų pasiskirstymas CMT1A grupėje



**5 pav.** Vidutinio amžiaus, kai pasireiškė pirmieji simptomai, ir amžiaus, kai patvirtinta CMT1A diagnozė, pasiskirstymas moterų ir vyrų grupėse



**6 pav.** Amžiaus charakteristikos diagnozės patvirtinimo metu moterų ir vyrų grupėse

CMT1A sergančioms moterims raumenų silpnumas kojose nustatytas 17 (85,00 proc.), o rankose – 8 (40,00 proc.) pacientėms. Vyrų grupėje raumenų silpnumas kojose nustatytas 12 (70,59 proc.), o rankose – 3 (17,65 proc.) pacientams. Raumenų atrofija pasireiškė 15 (75,00 proc.) moterų ir 9 (52,94 proc.) vyrams. Sutrikusį vibracijos jutimą labiau nei skausmo pojūtį kojose nurodė 14 (70,00 proc.), o rankose – 6 (30,00 proc.) pacientės. Objektivių jutimo sutrikimų kojose nenustatyta 4 (20,00 proc.) pacientėms, o rankose – 13 (65,00 proc.) pacienčių. Dvi pacientės (10,00 proc.) nurodė vienodą skausmo ir vibracijos sutrikimą kojose, o viena pacientė (5,00 proc.) – rankose. Vyrų grupėje sutrikęs vibracijos jutimas labiau nei skausmo jutimas nustatytas 6 (35,29 proc.) pacientams kojose ir vienam (5,88 proc.) pacientui rankose. Sausgyslių refleksų kojose negauta visoms pacientėms moterims ir 11 (64,71 proc.) pacientų vyrų. Sumažėję sausgyslių refleksai rankose gauti 11 (55,00 proc.) pacienčių, o trijų pacienčių (15,00 proc.) sausgyslių refleksai buvo normalūs. Vyrų grupėje sumažėję sausgyslių refleksai rankose gauti 4 (23,53 proc.) pacientams, o normalūs – 12 (70,59 proc.). Ėjimo pasistiebus sutrikimai nustatyti 12 (60,00 proc.) pacienčių, o ant kulnų negalėjo eiti 19 (95,00 proc.) pacienčių. Pėdų deformacija taip pat nustatyta 19 (95,00 proc.) pacienčių. Vyrų grupėje 7 (41,18 proc.) pacientai negalėjo eiti pasistiebę, o ant kulnų – 15 (88,24 proc.) pacientų. Pėdų deformacija nustatyta 15 (88,24 proc.) vyrų. Tyrime analizuoti rodikliai apibendrinti ir pateikti 17 lentelėje.

**17 lentelė.** Demografinių rodiklių ir fenotipų apibendrinimas CMT1A pacientų grupėse pagal lytį

	<b>Moterys, n = 20</b>	<b>Vyrai, n = 17</b>	<b>Iš viso, n = 37</b>	<b>p reikšmė</b>
Lytis, proc.	20 (54,05 proc.)	17 (45,95 proc.)	37 (100 proc.)	–
Vidutinis amžius, kai pasireiškė pirmi simptomai, metai	9,80 ± 9,27	8,23 ± 7,36		0,713
Vidutinis amžius diagnozės metu, metai	34,25 ± 19,60	20,88 ± 12,47		0,067
Pirmieji simptomai				
Kojose, proc.	20 (100 proc.)	16 (94,12 proc.)	36 (97,30 proc.)	0,460
Rankose, proc.	–	1 (5,88 proc.)	1 (2,70 proc.)	–
Raumenų silpnumas				
Kojose, proc.	17 (85,00 proc.)	12 (70,59 proc.)	29 (78,38 proc.)	0,428
Rankose, proc.	8 (40,00 proc.)	3 (17,65 proc.)	11 (29,73 proc.)	0,138
Raumenų atrofija	15 (75,00 proc.)	9 (52,94 proc.)	24 (64,86 proc.)	0,161

	<b>Moterys, n = 20</b>	<b>Vyrai, n = 17</b>	<b>Iš viso, n = 37</b>	<b>p reikšmė</b>
Jutimo sutrikimai				
Kojose, proc.	16 (80,00 proc.)	7 (41,18 proc.)	23 (62,16 proc.)	0,015*
Rankose, proc.	7 (35,00 proc.)	2 (11,76 proc.)	9 (24,32 proc.)	0,137
Negauti giliųjų saugyslių refleksai				
Kojose, proc.	20 (100 proc.)	11 (64,71 proc.)	31 (83,78 proc.)	0,005*
Rankose, proc.	6 (30,00 proc.)	1 (5,88 proc.)	7 (18,92 proc.)	–
Sutrikęs ėjimas pasistiebus, proc.	12 (60,00 proc.)	7 (41,18 proc.)	19 (51,35 proc.)	0,254
Sutrikęs ėjimas ant kulnų, proc.	19 (95,00 proc.)	15 (88,24 proc.)	34 (91,89 proc.)	0,584
Pėdų deformacija, proc.	19 (95,00 proc.)	15 (88,24 proc.)	34 (91,89 proc.)	0,584
Rankų tremoras, proc.	6 (30,00 proc.)	4 (23,53 proc.)	10 (27,03 proc.)	0,725
NVNU kojų skausmui, proc.	6 (30,00 proc.)	2 (11,76 proc.)	8 (21,62 proc.)	–
Chirurginis gydymas, proc.	3 (15,00 proc.)	4 (23,53 proc.)	7 (18,92 proc.)	0,680
Sveikatą grąžinantis gydymas, proc.	14 (70,00 proc.)	4 (23,53 proc.)	18 (48,65 proc.)	0,005*

*Paaiškinimai:* NVNU –nesteroidiniai vaistai nuo uždegimo.

\* pažymėti reikšmingi skirtumai tarp lyčių.

### 3.1.1.1. CMT1A fenotipų charakteristikų aptarimas

Šis kohortinis retrospektyvinis tyrimas apima pacientų, kuriems diagnozuotas CMT1A potipis, fenotipų charakteristikas. Tyrimo dalyviai gali būti laikomi tipiška CMT1A grupe, nes vidutinis amžius pagal lytį ir moterų bei vyrų lyčių santykis atitinka vidutines vertes. Atsižvelgiant į tai, kad CMT būdingas lėtas ligos progresavimas, skirtingas ligos paplitimas, taip pat yra ribotas specializuotų genetinės diagnostikos centrų skaičius šalyje, tyrimo dalyvių skaičius yra pakankamas rezultatų analizei atlikti. Šiame tyrime CMT1A diagnozuota 38 (31,14 proc.) pacientams iš 122 sergančių CMT liga pacientų. Šie duomenys panašūs į CMT1A dažnį Europos šalyse (Norvegijoje 19,6 proc. (Braathen, 2012), Belgijoje 69,7 proc. (Nelis et al., 1996), Lenkijoje 28 proc. (Kabzinska, Pierscinska, Kochanski, 2009)).

CMT1 pacientų grupėje (n = 64) CMT1A sudarė 59,37 proc. Taigi Lietuvoje šis skaičius yra šiek tiek mažesnis, nes kitose Europos šalyse CMT1A sudaro daugiau nei 70 proc. (Nelis et al., 1996).

Šiame tyrime pacientų amžiaus vidurkis, kai pasireiškė pirmieji simptomai, buvo 9,08 metų. Šis rezultatas sutampa su kitų tyrimų rezultatais ir rodo,

kad pirmieji simptomai paprastai pasireiškia vaikystėje ar paauglystėje (Fridman et al., 2015). Moterų grupėje pirmieji simptomai vidutiniškai pasireiškė 9,80 metų amžiaus, o vyrų grupėje 8,23 metų amžiaus. C. Colomban ir bendraautorių (Colomban et al., 2014) tyrimas atskleidė, kad moterims pirmieji simptomai pasireiškė žymiai anksčiau nei vyrams. Autorių nuomone, tikslų amžių, kai pasireiškia pirmieji simptomai, nustatyti sudėtinga, nes jis įvertinamas subjektyviai klausiant pacientų, kada jie pradėjo jausti pirmuosius simptomus. Tikslesnį simptomų pradžios laiką galima nustatyti vaikams, ypač kai simptomų pradžia patvirtinama pokyčiais NGL tyrime. Pacientų amžių, kai pasireiškia pirmieji neuropatijos simptomai, sunku tiksliai įvertinti retrospektyviai, nes pirmieji požymiai ir simptomai gali pasireikšti beveik nepastebimai ir patys pacientai gali jų nejausti. Įtariamos ligos požymiai gali skirtis tarp pacientų, o simptomų nejaučiantys pacientai gali būti įtariamai tik tuo atveju, jei CMT liga diagnozuota kitiems jų šeimos nariams.

Beveik visi pacientai, kuriems patvirtinta molekulinė CMT1A potipio diagnozė, nurodė pirmuosius simptomus, pasireiškiančius kojose, išskyrus vieną vyrą (2,70 proc.), kuriam pirmieji simptomai pasireiškė rankose. Anksčiau minėtų autorių tyrime pirmųjų simptomų pasireiškimas rankose buvo nustatytas 1,6 proc. pacientų. Tokiems pacientams atipinė simptomų pradžia gali atitolinti CMT ligos įtarimą. Šiame tyrime skoliozė kaip vienas iš pirmųjų simptomų nustatyta 3 (8,10 proc.) pacientams ir atitinka kituose tyrimuose gautus rezultatus (van Paassen et al., 2014).

Šis retrospektyvinis tyrimas parodė kelis skirtumus tarp lyčių: moterims jutimo sutrikimai kojose, negauti sausgyslių gilieji refleksai reikšmingai skyrėsi nuo vyrų. Moterų statistiškai reikšmingai dažniau periodiškai gavo reabilitacinį gydymą nei vyrai. Norėdami paaiškinti šiuos skirtumus, nagrinėjome amžiaus skirtumus tarp lyčių. Nustatėme, kad moterų, kurioms nustatyti giliųjų jutimų sutrikimai, amžiaus mediana buvo 46 metai (minimalus amžius 5 metai, maksimalus – 59 metai), o vyrų amžiaus mediana – 30 metų (minimalus amžius 10 metų, maksimalus – 58 metai). Moterų, kurioms nebuvo gauta sausgyslių giliųjų refleksų atsakų, amžiaus mediana buvo 39,5 metų (minimalus amžius 4 metai, maksimalus – 59 metai), o vyrų amžiaus mediana – 17 metų (minimalus amžius 9 metai, maksimalus – 58 metai). Reabilitacinį gydymą gavusių moterų amžiaus mediana buvo 46 metai, o vyrų amžiaus mediana – 30 metų. Įvertinę šiuos amžiaus rodiklius, galime daryti išvadą, kad statistiškai reikšmingo skirtumo tarp lyčių nebuvo. Vyrų ir moterų amžiaus skirtumo koregavimas paneigė statistinį skirtumą tarp lyčių. Neuropatijos požymių evoliucija reiškia, kad ligos simptomai atitinka natūralią CMT1A ligos



eigą. Išnykusius sausgyslių giliuosius refleksus paaiškina demielinizuojantis patogeninis neuropatijos mechanizmas, kuris lemia desinchronizuotą aferentinių neuronų kiekį. Kartu tai lemia ryškesnį jutimų sutrikimą. Vyresnio amžiaus pacientai dažniau gauna reabilitacinį gydymą galimai todėl, kad liga progresuoja ir jie patiria labiau išreikštus su neuropatija susijusius simptomus. Pastebėta, kad moterys yra jautresnės simptomų pasireiškimui nei vyrai (Columban et al., 2014).

Šis tyrimas turi trūkumų, nes buvo analizuoti duomenys, surinkti vienos genetinės konsultacijos metu. Tikslesnę pacientų, kuriems diagnozuotas CMT1A potipis, natūralios ligos eigos analizę vertinti reikėtų po ilgesnio pacientų stebėjimo laikotarpio viename specializuotame centre, kai pacientų stebėsenos planą sudaro reguliariai atliekamų standartizuotų tyrimų ir anketinių klausimų schema. Tokios natūralios CMT1A sergančių pacientų ligos eigos analizės išvados galėtų būti reikšmingos sudarant optimalų ilgalaikio stebėjimo planą, be to, gautų stebėsenos rezultatų kaupimas bei analizė ir dalijimasis informacija tarp šalių būtų naudinga kuriant naujus gydymo būdus CMT1A sergantiems pacientams.

### 3.1.2. Paveldimos neuropatijos su polinkiu į suspaudimo paralyžius pacientų fenotipų charakteristika

Šiame kohortiniame retrospektyviniame tyrime analizavome šešių pacientų, kuriems nustatyta CMT1A genetinės srities delecija, lemianti PNSP, fenotipų duomenis. Moterys sudarė 33,33 proc. ( $n = 2$ ), o vyrai 66,67 proc. ( $n = 4$ ). Vidutinis amžius, kai pasireiškė pirmieji simptomai, buvo  $24,83 \pm 8,95$  metų, o vidutinis amžius diagnozės patvirtinimo metu –  $35,33 \pm 12,58$  metų. Trijų pacientų genealogijų duomenys parodė AD paveldėjimą. Neuropatinio skausmo ir provokuojančių veiksnių nenurodė nė vienas pacientas. Klasikinis PNSP fenotipas pasireiškė 50 proc. pacientų. Į CMT panaši ligos eiga nustatyta 33,33 proc., o lėtinė sensorinė neuropatija – 16,67 proc. pacientų. Visiems pacientams pirmieji simptomai pasireiškė kojų nejautrumu ir tirpimu. Kojų deformacija (*pes cavus*) užfiksuota tik vienam pacientui. Visų šešių pacientų ENG tyrimo rezultatai parodė vidurinio nervo laidumo greičio pakitimus. Trims pacientams ENG tyrimo rezultatai parodė motorinę ir sensorinę demielinizuojančio tipo neuropatiją, nustačius sulėtėjusį nervinio impulso laidumo greitį esant pailgėjusiems distaliniams latentiniams periodams. Pacientų demografiniai ir klinikiniai duomenys apibendrinti 18 lentelėje.

**18 lentelė.** PNSP sergančių pacientų fenotipų charakterizavimas

Lytis	Amžius, kai diagnozuota PNSP, m.	Amžius, kai pasireiškė pirmieji simptomai, m.	Tipinis fenotipas		Atipinis fenotipas				Teigiama genealogija	Vidurinio nervo NLG		
			Pasikartojantys paralyžiai	Izoliuotas paralyžius	Praeinantys jutimo sutrikimai	Progresuojanti mononeuropatija	Panašūs į CMT simptomai	Lėtinė sensorinė neuropatija		Norma	< 38 m/s	> 38 m/s
M	56	20	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
V	38	36	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
V	31	22	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
V	17	15	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
V	34	20	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
M	36	36	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+

*Paaiškinimai:* M – moteris, V – vyras; + požymis nustatytas, – požymis nenustatytas.

### 3.1.2.1. PNSP fenotipo ypatumų aptarimas

PNSP pirmą kartą aprašyta De Jongo 1947 metais. Ji dažniausiai pasireiškia neskausminga židinine motorine ir sensorine mononeuropatija. Apie 70 proc. atvejų būdinga pasikartojanti židininė šeivinio ar alkūninio nervo neuropatija. Retai PNSP gali pasireikšti atipine eiga, pvz., progresuojančia mononeuropatija, lėtine sensorine neuropatija, trumpalaikiais jutimo sutrikimais ar CMT imituojančia ligos eiga (de Oliveira et al., 2016; Farooq, Martin, Andary, 2008; Flor-de-Lima et al., 2013). Šiame retrospektyviniame tyrime analizuojame 6 pacientų fenotipus, kuriems buvo nustatyta CMT1A genetinės srities delecija. PNSP dažniausiai pasireiškia antrajame dešimtmetyje (Chrestian et al., 2015). Šiame tyrime tik vienam pacientui nustatytas simptomų pasireiškimas iki 20 metų amžiaus. Klasikiniai PNSP simptomai pasireiškė trims pacientams. M. Luigetti ir bendraautorių retrospektyvinis tyrimas parodė, kad šiek tiek daugiau nei pusei pacientų pasireiškia atipiniai simptomai (Luigetti et al., 2014). Nedidelį identifikuotų atvejų skaičių galėtų paaiškinti „praeinantys“ / trumpalaikiai ir lengvos eigos PNSP ligai būdingi simptomai, dėl kurių pacientai nesikreipia į gydytojus.

## 3.2. Kohortinio perspektyvinio tyrimo rezultatai

### 3.2.1. Fenotipų, kuriuos lėmė mtDNR patogeniniai variantai, įvertinimas

Mitochondrinėms ligoms būdingas heterogeninis fenotipas, apimantis daugelį skirtingų organizmo sistemų, įskaitant PNS. Remiantis literatūros apžvalga, su mitochondrinėmis ligomis susijusių PN neurofiziologinės charakteristikos dažnai skiriasi tarp įvairių mitochondrinių sindromų. PN pasireiškimo ir jos tipo nustatymas gali padėti klasifikuoti mitochondrinį sindromą ir pasirinkti atitinkamus genetinius tyrimus.

Tiriamąją imtį sudarė 16 pacientų, kuriems 2015–2017 metais buvo įtartas pirminis mitochondrinis sindromas remiantis mitochondrinių ligų klinikiniais kriterijais (*Leigh* sindromas  $n = 3$ , MELAS  $n = 4$ , NARP  $n = 1$ , LPIO  $n = 4$ , KSS  $n = 1$ , LHON  $n = 3$ ). Objektiviūs neuropatijos požymiai nustatyti visiems pacientams.

Šešioms pacientams nustatyti patogeniniai variantai mitochondrijų genome. Dviem vaikams (1 ir 2 pacientai) patvirtintas *Leigh* sindromas atitinkamai nustačius patogeninius variantus NC\_012920.1:m.9185T>C (p.(Leu220Pro)) ir NC\_012920.1:m.8993T>C (p.(Leu156Pro)) *MT-ATP6* gene. Trims suaugusiems pacientams (3, 4 ir 5 pacientai) patvirtintas MELAS nustačius patogeninį variantą NC\_012920.1:m.3243A>G (p.(3243Gly)) *MT-TL1* gene ir vienai pacientei (6 pacientė) pavirtintas į MERRF panašus sindromas nustačius naują variantą NC\_012920.1:m.8353T>C *tRNA(Lys)* gene. Vienam pacientui (7 pacientas) iš tirtų 16 pacientų nustatyta nauja 5888 bp mtDNR delecija NC\_012920.1:m.6069\_11956del, lemianti *Kearns–Sayre* sindromą.

Pirma pacientė yra antras vaikas šeimoje, ji gimė 40 gestacijos savaitę. Prieš tai motina patyrė tris savaiminius persileidimus atitinkamai 12, 9 ir 9 nėštumo savaitę. Hipotonija pasireiškė nuo naujagimystės. Mergaitė sėdėti pradėjo 9 mėn. amžiaus, o vaikščioti prilaikoma – nuo 30 mėn. Viso kūno tremoras pastebėtas nuo 18 mėn. amžiaus, jis labiau išryškėdavo rankose ir pėdose bandant atlikti veiksmą ar pavargus. Garsažodžius tarti pradėjo 16 mėn. amžiaus, tačiau kalbos raida menkai progresavo ir 3 metų amžiaus mergaitė tarė tik kelis žodžius. 2,5 metų amžiaus atlikus galvos smegenų magnetinio rezonanso tomografijos (MRT) tyrimą nustatyti *Leigh* sindromui būdingi požymiai.

Antras pacientas yra pirmas vaikas šeimoje, jis gimė 40 gestacijos savaitę. Hipotonija diagnozuota 8 mėn. amžiaus. Ankstyvoji abilitacija skirta dėl vėluojančios motorinės raidos. Sėdėti pradėjo 8 mėn. amžiaus, o vaikščioti prilaikomas nuo 18 mėn. Kalba prasmingomis frazėmis nuo 2 metų amžiaus. 2,5 metų amžiaus dėl nestabilios eisenos, greito nuovargio, dažno griuvimo tirtas Vaikų

neurologijos skyriuje. Galvos smegenų MRT tyrimu nustatyti *Leigh* sindromui būdingi pokyčiai. Abiejų pacientų fenotipai palyginti 19 ir 20 lentelėse.

**19 lentelė.** Klinikinių simptomų santrauka

<b>Pažeistas organas ir (ar) sistema</b>	<b>1 pacientas</b>	<b>2 pacientas</b>
Simptomų pradžia	Iki 6 mėn.	Iki 6 mėn.
Judesių raidos sutrikimas	Taip	Taip
Akių pakitimai (nistagmas, žvairumas)	Taip	Taip
Disfagija	Taip	Ne
Epilepsija	Ne	Ne
Silpnas čiulpimo refleksas	Taip	Ne
Klausos sutrikimas	Ne	Ne
Kvėpavimo sutrikimai	Ne	Ne
Kardiologiniai sutrikimai	Ne	Ne
Kepenų funkcijos sutrikimai	Ne	Ne
Inkstų funkcijos sutrikimai	Ne	Ne
Hematologiniai sutrikimai	Ne	Ne
Periferinė neuropatija	Taip	Taip
Augimo sutrikimas	Ne	Ne
Mikrocefalija	Ne	Ne
Protinis atsilikimas	Ne	Ne

**20 lentelė.** Judėjimo sutrikimai ligos pasireiškimo pradžioje

<b>Motoriniai požymiai</b>	<b>1 pacientas</b>	<b>2 pacientas</b>
Hipotonija	Taip	Taip
Sumažėję ar išnykę giliųjų saugyslių refleksai	Taip	Ne
Distonija	Ne	Ne
Babinskio simptomas	Ne	Ne
Spastiškumas	Ne	Ne
Hipertonusas	Ne	Taip
Ataksija	Taip	Taip
Raumenų silpnumas	Taip	Taip
Kitos diskinezės*	Taip (tremoras, pusiausvyros sutrikimas)	Ne
Paralyžius	Ne	Ne
Chorėja / atetozė	Ne	Ne
<i>Pes cavus</i>	Ne	Ne
Mioklonusas	Taip	Taip
Hipokinezė / bradikinezė	Taip	Ne

\* Tremoras, dizartrijs, pusiausvyros sutrikimas, stereotipijos, opistotonusas, hiperkinezės, dispraksija, krumpliaračio fenomenas, nervingumas.

Trečiai pacientei pirmieji ataksijos požymiai pasireiškė vaikystėje, tačiau intensyvėjo vidutiniškai 18 metų amžiaus. Po 10 metų pacientei diagnozuotas I tipo cukrinis diabetas ir paskirtas gydymas insulinu. Tuo pačiu metu nustatytas abipusis neurosensorinis prikurtimas, tinklainės pigmentinė retinopatija. Regėjimo sutrikimai palaipsniui progresavo, išsivystė fotofobija, diplopija ir oftalmoplegija. 36 metų amžiaus pacientei klinikinio neurologinio tyrimo metu nustatyti sutrikę skausmo ir gilieji jutimai pėdose, labai žemi kelių sausgyslių refleksai, išnykę Achilo sausgyslės refleksai abipus, ataksija, koordinacijos ir motorikos sutrikimai apatinėse galūnėse. Tiriant galvinius nervus nustatyti riboti akių judesiai visomis kryptimis ir gauti žemi ryklės ir minkštojo gomurio refleksai. Konstatuota disfonija, dizartrijs ir disfagija. Viršutinėse ir apatinėse galūnėse nustatytas difuzinis raumenų jėgos susilpnėjimas, kuris įvertintas 4 balais iš 5. Taip pat nustatytas žemas raumenų tonusas ir išreikšta generalizuota hipotrofija. ENG tyrimu neišgautas odos blauzdos nervo jutiminis atsakas. Pacientė negalėjo atsistoti iš tupimos padėties. Galvos smegenyse MRT tyrimu židinių signalo intensyvumo pokyčių nenustatyta; nustatyta smegenų pusrutulių ir smegenėlių atrofija. Raumens biopsijos histologiniu tyrimu nustatyta židininė pavienių miocitų atrofija, citochromo oksidazės stoka iki 10 proc. miocitų ir gausios raudonos netolygios sankaupos pavieniuose miocituose.

Ketvirtai pacientei pirmieji raumenų silpnumo ir nuovargio simptomai pasireiškė ūmiai 22 m. amžiaus po kontakto su lakiosiomis cheminėmis medžiagomis darbo vietoje. Tuo metu pirmą kartą pacientei diagnozuota LPIO. Genetinės konsultacijos metu išsiaiškinta, kad pacientė jau vaikystėje prastai toleravo fizinį krūvį, buvo lėtesnė, greičiau pavargdavo, lėčiau bėgiojo. Jai sunkiau sekėsi mokytis, ypač išmokti atmintinai tekstą. Dažnai jautė mieguistumą. Iki 18 m. amžiaus pasireiškė vienas epizodas, kurio metu ji nebejautė kojų, pasireiškė dizartrijs. Atlikus raumens biopsijos histologinį tyrimą nustatyti nespecifiniai miopatiniai pakitimai. Pacientei buvo atlikti biocheminiai genetiniai tyrimai diferencijuojant nuo paveldimų medžiagų apykaitos ligų, tačiau pakitimų nebuvo nustatyta. Kelis kartus kartojant laboratorinius tyrimus, tik vieną kartą nustatyta nedaug padidėjusi laktato koncentracija kraujo serume (3,84 mmol/l (normos reikšmė 0,62–2,64 mmol/l)). Nuo 22 metų amžiaus pacientei kartą per mėnesį kartojosi sąmonės sutrikimo epizodai, sutriko rijimas, pasikeitė balsas, buvo sunku kalbėti, vargino nuolatinis galvos svaigimas, diplopija, pasireiškė pykinimas, kartais lydymas vėmimo, dispepsija, obstipaciją keitėsi į diarėją, arterinio kraujospūdžio svyravimai.

Progresavo fizinio krūvio netoleravimas. 28 m. amžiaus pacientė patyrė traukulių priepuolį, tačiau elektroencefalografiniu tyrimu epilepsijai būdingų pokyčių nenustatyta. Klinikinio neurologinio tyrimo metu nustatyta disfonija, dizartrija, hipomimija, sakadiniai akių judesiai visomis kryptimis, horizontalus nistagmas, diplopija, žemi gilieji sausgyslių refleksai kojose, proksimalinis viršutinių ir apatinių galūnių raumenų silpnumas (rankų proksimalinių raumenų jėga įvertinta 4 balais, distalinių – 5 balais iš 5; kojų proksimalinių raumenų jėga – 3–4 balais, distalinių – 5 balais iš 5). Tuo metu atlikus ENG tyrimą, nervinių skaidulų pažeidimas nenustatytas, o EMG tyrimu nustatyti atskirose skaidulose pakitę motorinių vienetų veikimo potencialai, kurie buvo polifaziniai, nedidelės trukmės ir amplitudės. Galvos smegenų MRT tyrimu nustatyta nežymi leukoencefalopatija abipus periventrikuliariai okcipitaliai.

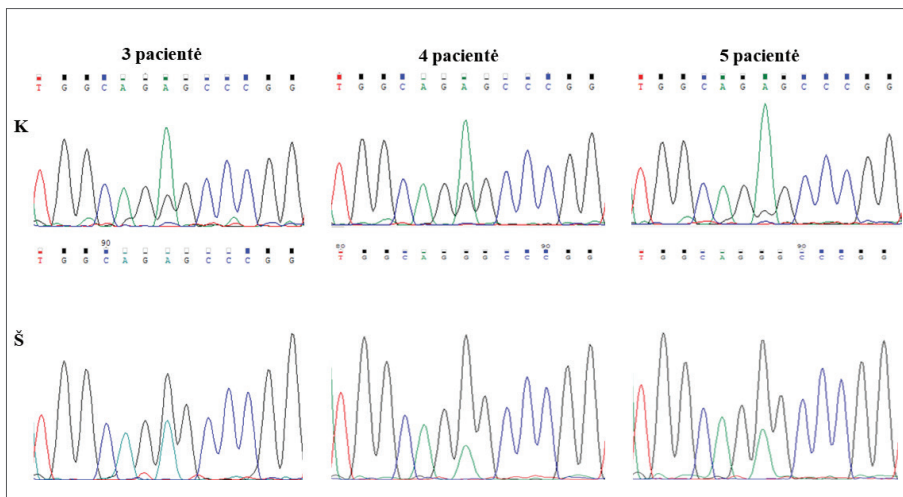
Penktai pacientei fizinio krūvio netoleravimas pasireiškė trečiame dešimtmetyje. Pacientę vargino pilvo pūtimas ir viduriavimas. Nuo 35 metų amžiaus nustatytas abipusis neurosensorinis klausos sutrikimas. 42 metų amžiaus diagnozuotas II tipo cukrinis diabetas ir paskirtas gydymas insulinu. Po 10 metų pacientė tirta dėl nuolatinio bendro silpnumo, virškinimo sutrikimų ir maudžiančio skausmo po dešinioju šonkaulių lanku. Atlikus laboratorinius tyrimus nustatytas padidėjęs kepenų transaminazių aktyvumas. Kepenų biopsijos tyrimu nustatyta židininė makro– ir mikrovezikulinė steatozė vidutiniškai 10 proc. hepatocitų. Keletą metų pacientę vargino galvos svaigimas. 47 metų amžiaus galvos smegenų MRT tyrimu nustatyti daugybiniai 2–9 mm skersmens židiniai abiejų pusrutulių baltojoje smegenų medžiagoje subkortikaliai. Nuo 50 m. amžiaus pacientė pastebėjo, kad silpsta jėga rankose ir kojose, tirpsta abiejų rankų pirštai, vakarais pasireiškia neramumas kojose. 56 metų amžiaus klinikinio neurologinio tyrimo metu nustatyta rinofonija, veido asimetrija, nežymi ptozė, žemi gilieji sausgyslių refleksai, normali raumenų jėga, hipotrofija ir sutrikusi koordinacija apatinėse galūnėse. ENG tyrimu nustatytas sumažėjęs odos blauzdos nervo jutiminis atsakas.

Fenotipų heterogeniškumą rodantys šių pacienčių simptomai pateikti 21 lentelėje, o 7 paveiksle – sekvenogramų fragmentai, apimantys m.3243G>A variantą.

**21 lentelė.** Pacienčių, kurioms patvirtintas MELAS, fenotipų charakterizavimas

		<b>3 pacientė</b>	<b>4 pacientė</b>	<b>5 pacientė</b>
	Simptomų pradžia	2-as dešimtmetis	1–2 dešimtmetis	2–3 dešimtmetis
	Amžius, kai atlikta vėliausia konsultacija, metai	36	30	55
	Ūgis, cm	157	162	162
	Svoris, kg	33	58	45
	Kūno masės indeksas	13,4	22,1	17,1
<b>CNS</b>	Insultas ir (ar) į insultą panašūs priepuoliai			
	MRT radiniai	Smegenų atrofija, smegenėlių atrofija	T2 sekose hiperintensinio signalo židiniai požievyje pakaušio srityse	T2 sekose hiperintensinio signalo židiniai požievyje, smegenėlių atrofija
	Encefalopatija			
	Kognityviniai sutrikimai			X
	Ataksija	X		
	Traukuliai			
	Migrena			
<b>PNS</b>	Neuropatija ir (ar) hiporefleksija	X	X	X
<b>Raumenys</b>	Miopatija ir (ar) silpnumas	X	X	X
	Fizinio krūvio netoleravimas	X	X	X
	Miopatiniai pokyčiai EMG		X	
<b>Klausa</b>	Klausos sutrikimas	X	X	X
<b>Rega</b>	Prozė ir (ar) oftalmoplegija	X	X	X
	Pirmentinis retinitas	X		
<b>Virškinimas</b>	Disfagija	X	X	X
	Dispepsija	X	X	X
	Žarnyno disfunkcija	X	X	X
<b>Širdis</b>	Kardiomiopatija			
	EKG pakitimai	X		
<b>Kepenys</b>	Kepenų disfunkcija			X
<b>Endokrininė sistema</b>	I tipo CD	X		
	II tipo CD			X
	Hipogonadizmas	X		
<b>Kita</b>	Laktacidozė		X	

*Paaiškinimai:* EKG – elektrokardiografija; CD – cukrinis diabetas; X – požymis yra.



**7 pav.** Pacienčių, kurioms identifikuota mtDNR pakaita NC\_012920.1:m.3243A>G, lemianti MELAS, sekvenogramų fragmentai, K – DNR, išskirtoje iš kraujo, Š – DNR, išskirtoje iš šlapimo nuosėdų ląstelių

Šeštai pacientei pirmieji fizinio krūvio netoleravimo simptomai pasireiškė 8 m. amžiaus. Mergaitė greitai pavargdavo eidama, negalėjo bėgti, buvo sunku lipti laiptais, sunkiai atsistojo nuo grindų. 10 m. amžiaus pirmą kartą atlikto klinikinio neurologinio tyrimo metu nustatytas difuzinis raumenų silpnumas ir generalizuota hipotrofija, teigiamas Gowerso simptomas. Atlikus laboratorinius tyrimus nustatyta hiperlaktatemija (10,2 mmol/l (normos reikšmė 0,62–2,64)). 12 m. amžiaus pasireiškė generalizuoti toniniai kloniniai priepuoliai ir paskirtas gydymas lamotriginu. Pradėjus gydymą, priepuolių pobūdis pasikeitė, išsivystė mioklonijos. Gydymas koreguotas leviteracetamu, per vienus metus priepuoliai sumažėjo ir nebesikartojė. Išlieka raumenų silpnumas ir ataksija. Šiai pacientei viso ilgio mtDNR sekoskaitos tyrimu identifikuotas variantas m.8353T>C *tRNA(Lys)* gene, kuris, manome, paaiškina pacientės fenotipą.

Septintam pacientui nuo vaikystės pasireiškė *KSS* sindromui būdingi simptomai – širdies laidžiosios sistemos sutrikimas, pigmentinis retinitas, LPIO, neurosensorinis klausos sutrikimas, ataksija, žemas ūgis. Septynių metų amžiaus dėl atrioventrikulinės blokados persistuojančių sinkopių implantuotas kardioverteris. 17 metų amžiaus kojose kelių ir Achilo sausgyslių refleksų atsakų negauta. Raumenų jėga rankose įvertinta 5 balais, o kojose – 2 balais iš 5. Nustatytas nistagmas, galvos ir rankų tremoras. Progresuojant raumenų silpnumui ir ataksijai, pacientas savarankiškai nejuda nuo 19 metų amžiaus. San-





ir m.3243A>G (Bouillot et al., 2002; Finsterer, 2011; Kaufmann et al., 2006). Nors daugumai sergančiųjų neuropatija gali būti kliniškai nereikšminga, pacientams, sergantiems MELAS, MERRF ir *Leigh* sindromais, ji gali būti greitai besivystanti ir sunkios eigos.

Vidutiniškai 32 proc. iš motinos paveldėto *Leigh* sindromo atvejų lemia patogeniniai mtDNR variantai (Naess et al., 2009). Trečdaliui iš jų nustatomas m.8993T>G variantas arba labiau išreikštą fenotipą lemiantis m.8993T>C variantas *MT-ATP6* gene, kurie buvo aprašyti pirmiausia (de Vries et al., 1993; Tatuch et al., 1992). Nors mtDNR paveldima iš motinos, daugelis pacientų, kuriems nustatyti patogeniniai mtDNR variantai, stokoja teigiamų genealogijų duomenų, leidžiančių įtarti mtDNR ligą. Tai gali būti todėl, kad kitų šeimos narių patogeninių variantų heteroplazmijos slenkstis yra žemesnis už nustatyto patogeninio varianto patogeninę ribą. mtDNR *de novo* variantai taip pat yra gana dažnai nustatomi, todėl variantas, esantis dideliame heteroplazmijos lygyje probandui, gali būti nenustatomas motinai ir kitiems motinos giminaičiams. mtDNR variantų nulemtas *Leigh* sindromas paprastai pasireiškia iki 2 m. amžiaus (Naess et al., 2009; Rahman et al., 1996). Šiame tyrime dviem vaikams, kuriems nustatyti patogeniniai *MT-ATP6* geno variantai, gilieji sausgyslių refleksai buvo išnykę, pasireiškė hipotonija, ataksija ir abipusis tremoras veiksmo metu. Nepaisant to, kad subklinikiniai neuropatijos požymiai buvo nustatyti, ENG tyrimas nebuvo atliktas dėl jauno pacientų amžiaus. Abiejų pacientų motinos buvo homoplazminių mutacijų nešiotijos, tačiau neurologinių sutrikimų, įskaitant neuropatiją, joms nebuvo nustatyta.

NC\_012920.1:m.3243A>G variantas *MT-TL1* gene yra labiausiai paplitusi MELAS priežastis. Išeminis insultas ar į insultą panašūs priepuoliai yra pagrindinė sindromo išraiška, kurią patvirtina galvos smegenų MRT tyrimo radiniai dažniausiai pakaušio srityje. Fenotipo kintamumas šiame tyrime nustatytas vienai pacientei, kuriai galvos smegenų MRT tyrimu MELAS būdingų patognominių požymių nebuvo nustatyta, tačiau anksti pasireiškė ataksija ir kiti mitochondrijų disfunkcijai būdingi simptomai. „Ataksija plus“ fenotipas neretai būdingas mitochondrijų disfunkcijai (Bargiela et al., 2015). Nustatyta, kad 22–77 proc. pacientų, kuriems diagnozuotas MELAS, pasireiškia neuropatija (Karppa et al., 2003; Kaufmann et al., 2006; Mancuso et al., 2014). Šiame tyrime visos trys pacientės skundėsi parestezijomis ir pėdų tirpimu, o viena jų – ir eisenos nestabilumu (ataksija). Šioms pacientėms klinikinio neurologinio tyrimo metu nustatyti požymiai, būdingi neuropatijai: labai sumažėję arba išnykę gilieji sausgyslių refleksai ir sumažėjusi raumenų jėga distalinėse kojų dalyse. ENG tyrimu dviem iš trijų suaugusių pacienčių nustatytas aksoninio

tipo nervinių skaidulų pažeidimas. Svarbu tai, kad anksčiau atliktuose tyrimuose įrodyta, kad nėra koreliacijos tarp neuropatijos ir cukrinio diabeto. Vertinant retrospektyviai, nors šioms pacientėms ir pasireiškė mitochondrinėms ligoms būdingi simptomai, genetinei konsultacijai ir simptomų etiologijai nustatyti jos buvo atsiųstos vėlai. Tai rodo, kad mitochondrinės ligos fenotipas dažnai gali būti neįtartas kasdienėje klinikinėje praktikoje.

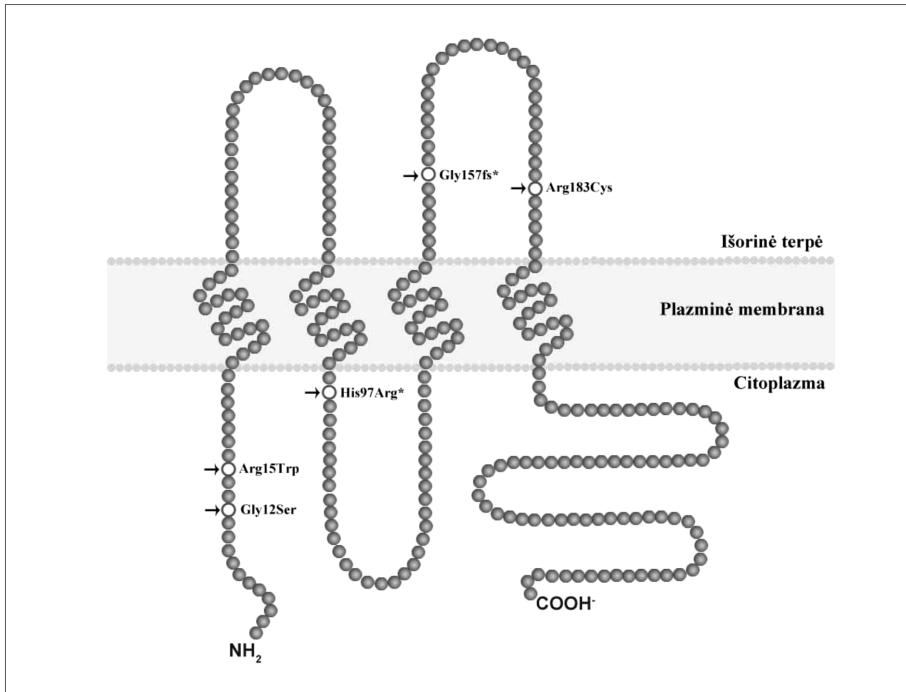
Šeštai pacientei, kuriai nustatytas naujas mtDNR variantas m.8353T>C, pasireiškė į MERRF sindromą panašus fenotipas. Šioje labai konservatyvioje geno srityje yra anksčiau aprašytas variantas m.8356T>C, kuris lemia MERRF (Chi, 2015; Silvestri et al., 1992). Pacientei buvo įtarta mitochondrinė liga tuo metu, kai mtDNR sekoskaitos nebuvo galima atlikti, todėl skersaruožių raumenų biopsijos histologinis tyrimas buvo svarbus diagnozei ir gydymui.

Nauja 5888 bp mtDNR delecija NC\_012920.1:m.6069\_11956del, nustatyta septintam pacientui, patvirtino fenotipinę KSS sindromo diagnozę. Dėl nustatytos 5888 bp delecijos sutriko 8-ių baltymus koduojančių (*COI*, *ND4*, *CO2*, *ATP8*, *ATP6*, *CO3*, *ND3*, *ND4L*) ir 5-ių tRNR koduojančių (*TS1*, *TD*, *TK*, *TG*, *TR*) genų raiška, lėmusi mitochondrijų energijos gamybos sutrikimą.

### 3.2.2. GJB1 geno sekoskaitos ir fenotipų charakterizavimas

Šiame tyrime *GJB1* geno sekoskaita buvo atlikta 84 pacientams (CMT1 n = 20, CMT2 n = 42, CMT-T n = 21). Patogeniniai *GJB1* geno sekos variantai nustatyti 6 pacientams (NM\_000166.5:c.34G>A (p.(Gly12Ser)), NM\_000166.5:c.43C>T (p.(Arg15Trp)), NM\_000166.5:c.290A>G (p.(His97Arg)), NM\_000166.5:c.547C>T (p.(Arg183Cys)), NM\_000166.5:c.476delG (p.(Gly159Alafs))). Šiame tyrime dviem pacientams nustatytas naujas *missense* patogeninis variantas NM\_001097642.2:c.290A>G (p.(His97Arg)) ir skaitymo rėmelio poslinkį lemianti vieno nukleotido delecija NM\_000166.5:c.476delG (p.(Gly159Alafs)) vienai pacientei. Taip pat du patogeniniai variantai nustatyti *GJB1* baltymo N domene citoplazmoje (p.Gly12Ser ir p.Arg15Trp), citoplazminėje kilpoje (p.His97Arg) ir antroje išorinėje kilpoje (p.Gly157fs ir p.Arg183Cys) (žr. 9 pav.).

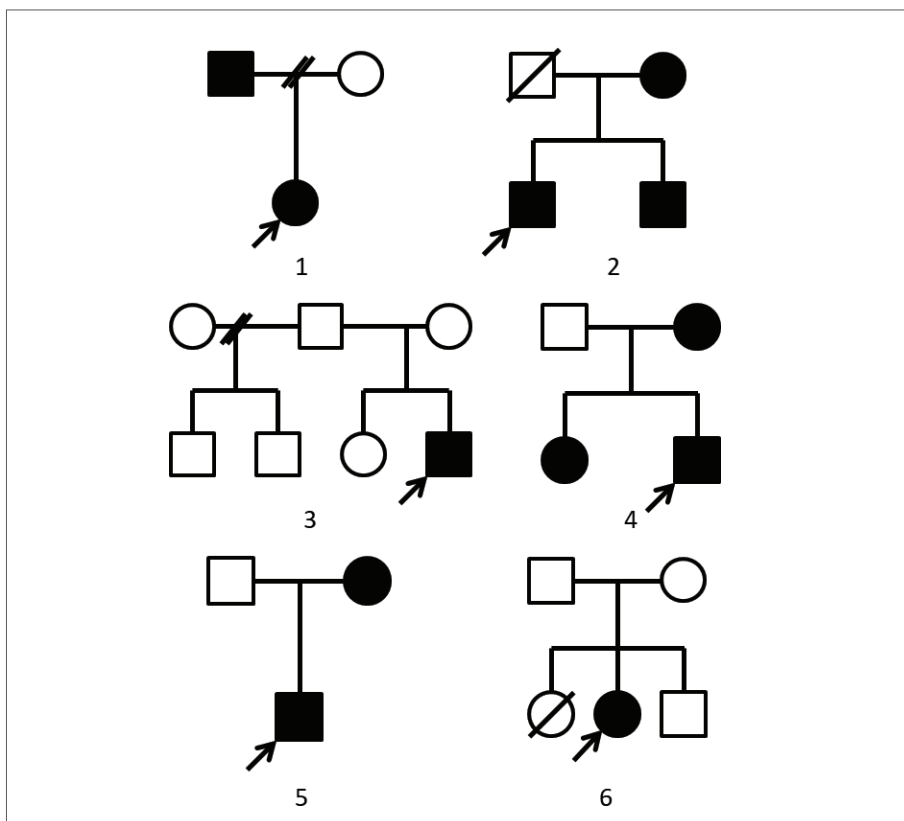
Naujai nustatytas *missense* galimai patogeninis variantas c.290A>G lemia aminorūgšties histidino pasikeitimą į argininą 97 padėtyje. Variantas nėra *ClinVar*, *1000 Genomes* projekto ir *ExAc* duomenų bazėse. Variantas vertinamas kaip galimai patogeninis remiantis DANN (0,99), CADD (19,98), GERP (4,67), LRT (0,84), *MutationAssessor* (2,95), *MutationTaster* (0,99), *SIFT* (0), *PolyPhen2* (0,79) ir PROVEAN (-4,68) įverčiais. Tarp žinomų šiame tyrime



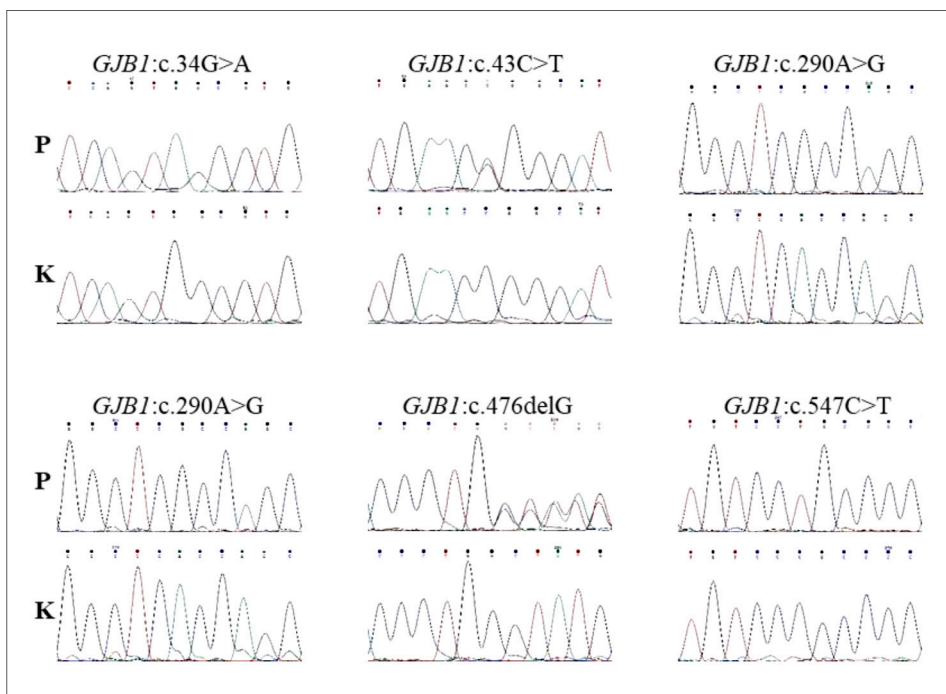
**9 pav.** Patogeninių *GJB1* geno variantų, identifiкуotų šiame tyrime, diagrama. \* nurodo naujai identifiкуotus variantus. Adaptuota pagal: Kleopa, Sargiannidou, 2015.

nustatytų patogeninių variantų variantas c.34G>A nustatytas pacientei, kurios tėvui, atlikus segregacijos analizę, taip pat nustatytas šis variantas. Variantas c.43C>T nustatytas pacientui, kuriam pasireiškė sunkios eigos neuropatija. Atitinkamai, c.43C>T variantas nustatytas paciento dukrai, jo broliui, brolio dukrai ir motinai. Patogeninis variantas c.547C>T nustatytas pacientui, kurio motina buvo besimptomė varianto nešiotija. Genealogijos ir *GJB1* sekoskaitos rezultatai pavaizduoti 10 ir 11 paveiksluose. Keturi pacientai buvo priskirti CMT-T tipui, o du – CMT2 tipui. Keturi pacientai buvo vyrai, o dvi moterys. Šių pacientų amžius, kai pasireiškė pirmieji simptomai, kito nuo 8 iki 35 metų. Remiantis genealogijų duomenimis, keturiems pacientams įtartas su X chromosoma susijęs paveldėjimo tipas. Dviejų pacientų, kuriems nustatyti nauji patogeniniai variantai c.290A>G ir c.476delG, šeimos nariai neatvyko į konsultaciją ir atlikti tyrimų. Kitų keturių pacientų šeimose atliktas nustatytų patogeninių variantų segregacijos tyrimas. Penkiems pacientams, kuriems nustatyti *GJB1* patogeniniai variantai, pirmieji simptomai pasireiškė eisenos sutrikimu ir jie negalėjo bėgti. Šiems pacientams taip pat pasireiškė įvairaus

sunkumo (nuo lengvo iki sunkaus) raumenų atrofija, jutimų sutrikimas, sumažę sausgyslių refleksai ir pėdų deformacijos. Silpnumas ir atrofija buvo nustatyti distalinėse apatinių galūnių dalyse, pvz., priekiniame blauzdos ir dvilypiame blauzdos raumenyse, be akivaizdaus proksimalinių raumenų pažeidimo. Visi pacientai savarankiškai vaikščioti pradėjo iki 15 mėn. amžiaus. Vienam pacientui CMT buvo nustatyta tiriant stacionare po ūmaus trumpalaikio į insultą panašaus priepuolio, kuris pasireiškė hemiplegija, disfagija, dizartrija ir afazija. Tremoras nustatytas dviem pacientams, skoliozė – vienam pacientui, o kognityviniai sutrikimai – vienai pacientei. Pacientų, kuriems šiame tyrime nustatyti patogeniniai variantai, genealogijos pateiktos 10 paveiksle, *GJB1* sekvenogramų fragmentai – 11 paveiksle, o klinikiniai požymiai ir identifikuotų variantų charakterizavimas – 22 ir 23 lentelėse.



**10 pav.** Genealogijos, kuriose nustatyti *GJB1* patogeniniai variantai. Asmenys, kuriems nustatyti patogeniniai variantai, pažymėti juodos spalvos simboliais, rodyklė iš kairės nurodo probandą.



**11 pav.** *GJB1* sekvenogramos: P – pacientų sekvenogramų fragmentai; K – laukinio tipo alelio sekvenogramų fragmentai

**22 lentelė.** Pacientų fenotipų charakterizavimas

Pacientas	Lytis	Amžius, kai pasireiškė pirmieji simptomai, m.	Pirmieji simptomai	Amžius diagnozės metu, m.	CMT tipas *	Raumenų silpnumas		Raumenų atrofija	Jutimų sutrikimas	Refleksai		Pėdų deformacija	Kiti simptomai
						R	K			Kelių	Achilo		
1	M	15	Šlepsinti eisena, krypsta dešinė koja	21	CMT2	-	+	Lengva	-	S	S	Taip	Tremoras, kognityviniai sutrikimai
2	V	8	Šlepsinti eisena	28	CMT-T	++	++	Sunki	V	N	N	Taip	-
3	V	16	Šlepsinti eisena	29	CMT-T	+	++	Vidutinė	S > V	N	N	Taip	Tremoras
4	V	15	Šlepsinti eisena, kojų silpnumas	19	CMT2	++	++	Vidutinė	V	S	N	Taip	Skoliozė
5	M	35	Nukabo dešinė pėda	36	CMT1	-	++	Lengva	-	S	N	Taip	-
6	V	12	Pasikartojantys trumpalaikiai į insultą panašūs epizodai	12	CMT-T	-	-	Nėra	-	S	N	Taip	-

*Paaikškinimai:* \* CMT tipas nustatytas pagal NLG tyrimo rezultatus.

Sausgyslių refleksai: G – normalūs, S – susilpnėję, N – negauti.

Raumenų silpnumas kojose (K): + pėdų dorzifleksija ≤ 4/5.

Raumenų silpnumas rankose (R): + plaštakos raumenų silpnumas 4/5; ++ plaštakos raumenų silpnumas < 4/5; – normali jėga.

Jutimų sutrikimas: S – sutrikęs skausmo jautimas, V – sutrikęs vibracijos jautimas.

**23 lentelė.** Nustatytų *GJB1* geno variantų charakterizavimas

Variantas	Genotipas	Paieška žmogaus genomo duomenų bazėse <sup>1</sup> : 1000G; ESP; ExAC	<i>In silico</i> analizė <sup>2</sup> : GERP; SIFT; PP2; CADD
NM_001097642.2:c.34G>A (p.(Gly12Ser))	htz	–	4,36; 0*; 0,99*; 25,6*
NM_001097642.2:c.43C>T (p.(Arg15Trp))	hmi	–	4,36; 0*; 0,99*; 31*
NM_001097642.2:c.290A>G (p.(His97Arg))	hmi	–	4,67; 0*; 0,79*; 19,98*
NM_000166:c.476delG (p.(Gly159Alafs))	htz	–	4,81; –; –; –
NM_001097642.2:c.547C>T (p.(Arg183Cys))	hmi	–	4,99; 0*; 1*; 29,2*

*Paaiškinimai:* Genotipas: htz – heterozigotinis, hmi – hemizigotinis; <sup>1</sup>Žmogaus genomo duomenų bazės: varianto alelio dažniai *1000 Genomes* projekte (1000G: 2018 m. kovo mėn., <http://www.1000genomes.org/>), egzomų sekoskaitos projektas (ESP: 2015 m. kovo mėn., <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) ir egzomų kaupimo ir saugojimo konsorciūmas (ExAC: ver. 0.3.1, <http://exac.broadinstitute.org/>);

<sup>2</sup>*In silico* analizė: GERP (genominės evoliucijos greičio profiliavimo rezultatas, kuo didesnis įvertis, tuo konservatyvesnė sritis, įverčių intervalas nuo –12,3 iki 6,17), SIFT (<http://sift.jcvi.org>), PolyPhen2 (PP2: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) ir CADD (<http://cadd.gs.washington.edu/>) programos;

\* įrodo patogeniškumą.

### Trijų pacientų, kuriems nustatyti nauji *GJB1* patogeniniai variantai, fenotipų aprašymas

#### *3 pacientas*

29 m. amžiaus pacientui nuo 16 metų pasireiškė pėdų deformacija, pasikeitė eisena, progresavo kojų silpnumas. 19 m. amžiaus atlikto ENG tyrimo metu nustatytas mišrus demielinizuojančio ir aksoninio tipo nervinių skaidulų pažeidimas. Pacientas 10 metų į gydytojus nesikreipė. 29 m. amžiaus kreipėsi dėl labai pablogėjusios judėjimo funkcijos. Objektyvaus neurologinio tyrimo metu nustatyta kojų hipestezija žemiau kelių, sutrikęs vibracijos jutimas distaliau čiurnų bei kojų padėties jutimas. Sausgyslių refleksai simetriški, rankų – žemi, kelių ir Achilo sausgyslės refleksai neišgauti abipus. Nustatyta plaštakų tarpdėlnakaulinių raumenų ir kojų raumenų atrofija, labiausiai distalinėse dalyse, pėdų deformacija (*pes cavus*). Pacientas negalėjo paeiti ant pirštų bei kulnų, sunkiai atsistojo iš tupimos padėties. Rankų raumenų jėga įvertinta 3 balais iš 5, kojų proksimalinių raumenų jėga – 4 balais, distalinių – 0 balų iš 5. Pacientas nebuvo kreipęsis dėl ortopedijos priemonių ar chirurginio gy-



dymo. Genealogijos duomenimis, kitų sergančių šeimos narių nebuvo. *GJB1* geno sekoskaitos tyrimu identifikuotas naujas hemizigotinis patogeninis variantas NM\_001097642.2:c.290A>G (p.(His97Arg)). Paciento šeimos nariai atlikti identifikuoto varianto segregacijos tyrimų neatvyko.

#### *4 pacientas*

19 m. amžiaus pacientui nuo 15 metų pasireiškė nuovargis kojose po fizinio krūvio, pėdų deformacija, skoliozė. Pacientas prisiminė, kad nuo vaikystės jis negalėjo paeiti ant kulnų. Objektyvaus neurologinio tyrimo metu nustatytas sutrikęs vibracijos jutimas distaliau čiurnų. Sausgyslių refleksai simetriški, rankų – normalūs, kelių – vidutiniai ir Achilo sausgyslės refleksai neišgauti abipus. Nustatyta plaštakų tarpdelnakaulinių raumenų ir kojų raumenų atrofija, labiausiai distalinėse dalyse, pėdų deformacija (*pes cavus*). Rankų raumenų jėga įvertinta 4 balais iš 5, kojų proksimalinių raumenų jėga – 5 balais, distalinių – 2–3 balais iš 5. ENG tyrimu nustatytas ryškus aksoninio tipo nervinių skaidulų pažeidimas: kojose abipus šėvinio nervo motorinių atsakų negauta distaliai, priekinio blauzdos nervo atsakų sumažėjusios amplitudės esant normaliems latentiniams periodams bei impulso plitimo greičiams ir neišgauti juntamųjų nervų (blauzdos odos nervo abipus) atsakai. Rankų vidurinio nervo atsakas labai mažas, pailgėjęs distalinis latentinis periodas (5 ms), lėtesnis impulso sklidimo greitis distaliai (40,0 m/s); alkūninio nervo motorinio atsako amplitudė normali esant ribiniam distaliniam latentiniam periodui ir sulėtėjusiam impulso sklidimo greičiui (46,7 m/s), o vidurinio ir alkūninio nervo juntamojo atsako amplitudės sumažėjusios, impulso sklidimo greitis distaliai sulėtėjęs (29,3 m/s). *GJB1* gene nustatytas hemizigotinis naujas variantas NM\_001097642.2:c.290A>G (p.(His97Arg)). Genealogijos duomenimis, kitų sergančių šeimos narių nebuvo, tačiau *GJB1* gene heterozigotinis variantas NM\_001097642.2:c.290A>G (p.(His97Arg)) nustatytas paciento motinai ir seseriai, kurioms klinikiniai simptomai nepasireiškė.

#### *5 pacientė*

36 m. amžiaus pacientė kreipėsi dėl prieš metus pasikeitusios dešinės pėdos padėties: ji nukabo ir tapo nestabili. Objektyvaus neurologinio tyrimo metu nustatyta kojų hipestezija žemiau kelių, ryškesnė dešinėje, sutrikęs vibracijos jutimas pėdose. Sausgyslių refleksai simetriški, rankų – normalūs, kelių – žemi ir Achilo sausgyslės refleksai neišgauti abipus. Raumenų jėga rankose normali. Dešinės pėdos dorsofleksija įvertinta 0 balų iš 5, plantoflek-

sija – 3 balais iš 5. Kairės pėdos raumenų jėga įvertinta 4 balais iš 5. Nustatyta nežymi plaštakų ir pėdų raumenų atrofija. Pacientė negalėjo paeiti ant kulnų, atsitūpti, pasireiškė pėdų deformacija. ENG tyrimu nustatytas demielinizuojančio tipo motorinių ir sensorinių nervų skaidulų pažeidimas. Kojose abipus distaliai šėvinio nervo motorinių atsakų negauta, blauzdos nervo atsakas labai žemas, žema amplitudė (0,6 mV) esant pailgėjusiam latentiniam periodui (7,2 ms) bei neišmatuojamam impulso plitimo greičiui ir neišgauti juntamųjų nervų (blauzdos odos nervo abipus) atsakai. Registruoti pakitę rankų vidurinio ir alkūninio nervų motoriniai atsakai, o juntamųjų nervų atsakų neregistruota. Šiai pacientei *GJB1* gene identifiukuota nauja vieno nukleotido delecija NM\_000166:c.476delG (p.(Gly159Alafs)) esant heterozigotinei būklei.

### 3.2.2.1. *GJB1* genotipų ir fenotipų aptarimas

Šiame tyrime buvo nustatyti keturi *missense* patogeniniai *GJB1* variantai, iš kurių vienas naujas *missense* variantas NM\_001097642.2:c.290A>G (p.(His97Arg)) atlikus *GJB1* molekulinę analizę. *In silico* analizė nurodė patogeniškumo įverčius. Taip pat nustatyta nauja skaitymo rėmelio poslinkį lemianti vieno nukleotido delecija NM\_000166.5:c.476delG (p.(Gly159AlafsTer35)). Šiuo metu žinoma, kad yra daugiau nei 400 *GJB1* geno patogeninių variantų, įskaitant *missense*, delecijas ir skaitymo rėmelio poslinkį lemiančias pakaitas (Liu et al., 2017). Kadangi skirtingi *GJB1* patogeniniai variantai, įskaitant delecijas, lemia panašios eigos ir sunkumo neuropatiją, dauguma ar net visi *GJB1* variantai gali sukelti funkcijos praradimą formuojantis Švano ląstelės mielininiam dangalui (Shy et al., 2007). Tyrimais įrodyta, kad daugelis *GJB1* patogeninių variantų, susietų su CMT1X, paveikia baltymą taip, kad jis lieka endoplazminiame tinkle arba Goldžio komplekse ir nepasiekia ląstelės membranos, todėl nesusidaro tarpinės jungtys (Yum et al., 2002; Kyriakoudi et al., 2017; Kleopa, Yum, Scherer, 2002). *GJB1* yra tarpinės jungties baltymas, kurio raiška vyksta įvairiose ląstelėse, įskaitant oligodendrocitus ir astrocitus, bei audiniuose, tokiuose kaip kepenys, smegenys ir kasa. *GJB1* baltymas palaiko neuronų pralaidumą. Vidutiniškai 7 proc. CMT1X pacientų pasireiškia CNS sutrikimai (Hanemann et al., 2003; Kassubek, Bretschneider, Sperfeld, 2005). Šiame tyrime nustatyti du variantai NM\_000166.5:c.43C>T (p.(Arg15Trp)) ir NM\_000166.5:c.547C>T (p.(Arg183Cys)), kurie, literatūros duomenimis, lemia CNS disfunkciją (Scherer, Kleopa, 2012). Šeimoje, kurioje nustatytas variantas NM\_000166.5:c.43C>T (p.(Arg15Trp)), nė vienam sergančiam pacientui CNS simptomai nenustatyti. Pacientui, kuriam nustatytas patogeninis

NM\_000166.5:c.547C>T (p.(Arg183Cys))variantas, paveldėtas iš klinikinių simptomų neturinčios motinos, pirmieji simptomai pasireiškė ūmiu, trumpalaikiu į insultą panašiu epizodu. Galvos smegenų MRT tyrimu patologinių pokyčių nebuvo nustatyta, tačiau kiti tyrimai, kuriais būtų galima nustatyti CNS pažeidimą, pacientui nebuvo atlikti. Anksčiausiai *GJB1* variantų sukelta CNS disfunkcija pasireiškė vaikui iki 5 m. amžiaus (Siskind et al., 2009). CMT1X potipis CNS simptomais pasireiškia retai, nors kartais pasireiškia trumpalaikis, sunkus CNS pažeidimas, pasižymintis ataksija ir dizartrijsa. Kitiems CMT1X sergantiems pacientams gali būti silpnai pasireiškiantis ar besimptomis CNS sutrikimas. Pacientei, kuriai nustatytas heterozigotinis patogeninis NM\_000166.5:c.34G>A (p.(Gly12Ser)) variantas, nuo vaikystės pasireiškė kognityviniai sutrikimai. Moterims klinikiniai simptomai pasireiškia įvairiai, dažniausiai esant vyresnio amžiaus. Šiame darbe aprašoma pacientei neuropatijos požymiai pasireiškė paauglystės laikotarpiu. Manoma, kad CNS simptomai pasireiškia todėl, kad *GJB1* raiška vyksta oligodendrocituose, o pakitęs / funkciją įgijęs baltymas lemia lėtinę jų demielinizaciją (Kleopa et al., 2002; Kleopa et al., 2006).

Naujai nustatytas *missense* variantas NM\_001097642.2:c.290A>G (p.(His97Arg)) išplėtė *GJB1* genotipų įvairovę. Molekulinė segregacijos analizė buvo atliekama tik vieno paciento moteriškosios lyties šeimos nariams. Kito paciento motina neuropatijai būdingų simptomų nepatyrė ir atlikti molekulinę genotipų tyrimų neatvyko. 4-to paciento motinai ir seseriai, kurios nepatyrė neuropatijai būdingų simptomų, buvo nustatytas NM\_001097642.2:c.290A>G (p.(His97Arg)) variantas. Motinai atliktas ENG tyrimas parodė subklinikinį PNS pažeidimą. Šis reiškinys rodo, kad moterys yra mažiau paveiktos arba gali visai nepatirti simptomų, tikėtina, dėl atsitiktinės X chromosomos inaktyvacijos (Siskind et al., 2011). Tai reiškia, kad tik dalyje Švano ląstelių vyksta pakitusio *GJB1* raiška.

Išnagrinėjus visų šešių pacientų ENG tyrimo rezultatus, vidurinio nervo NLG, rodantis aksoninio tipo pažeidimą (> 38 m/s), nustatytas dviem pacientams. Tarpiniam tipui būdingas NLG nustatytas trimis, o demielinizuojančiam tipui būdingas NLG – vienai pacientei. Tyrimais įrodyta, kad ligos pradžioje vyksta demielinizacija, lydima lėtinės remielinizacijos, o vėliau, progresuojant ligai ir demielinizacijai pasiekus tam tikrą kritinį mastą, pasireiškia aksonų praradimas (Kleopa, Sargiannidou, 2015). Vyrams būdingas tarpinio tipo NLG sulėtėjimas ir šiek tiek pailgėjęs motorinių nervų distalinis latentinis periodas. Tiriant distalinę rankos dalį nuo alkūnės iki pirštų, nustatytas NLG vidutiniškai 30–40 m/s sergantiems vyrams, o sergančioms moterims 30–50 m/s (Jerath et al., 2016; Shy et al., 2007). Šiuos skirtumus taip pat paaiškina atsitiktinė X chromosomos

inaktyvacija. Šiame tyrime pacientui vyrui, kuriam nustatytas naujas c.290A>G variantas, ENG tyrimo rezultatai parodė aksoninio tipo pažeidimą. Šie duomenys papildė naujai nustatyto varianto poveikį fenotipui. Kitų pacientų NLG tyrimų rezultatai atitinka ankstesnių tyrimų išvadas.

Taigi, šiame tyrime nustatėme du naujus *GJB1* variantus, lemiančius CMT1X potipį. CMT1X turėtų būti įtrauktas į diferencinę diagnostiką vaikams, kuriems pasireiškia trumpalaikis CNS sutrikimas ir periferinės neuropatijos požymiai.

### 3.2.3. *MPZ* geno tyrimas ir fenotipų ypatumai

*MPZ* geno sekoskaita atlikta 76 pacientams. *MPZ* geno patogeniniai variantai nustatyti 2 (2,63 proc.; 2/76) pacientams. Kūdikystės laikotarpiu pasireiškiančiai PN, susijusiai su *MPZ* geno patogeniniais variantais, būdingas vėluojantis savarankiškas vaikščiojimas, kai vaikai pradeda vaikščioti mažiausiai nuo 15 mėn. amžiaus (vidutiniškai 18–48 mėn.), ir simptomų pasireiškimas iki 5 metų amžiaus.

6 metų amžiaus mergaitė gimė sveikiems tėvams. Vienų metų amžiaus ji sirgo kairės akiduobės celiulitu, kuris komplikavosi akiduobės viršantkauliniu abscesu. Mergaitei atlikta etmoidektomija, kairės orbitos dekompresija, taip pat skirtas konservatyvus gydymas. Savarankiškai vaikščioti ji pradėjo 2 metų 4 mėnesių amžiaus. Pradėjus vaikščioti, tėvai pastebėjo, kad mergaitės eisena nestabili, ji greitai pargriūna. Mergaitei diagnozuota III laipsnio plokščiapėdystė, kelių sąnarių hiperekstenzija. Ji konsultuota gydytojo genetiko, tačiau genetinė patologija nenustatyta. 4 metų amžiaus mergaitė tirta vaikų reabilitacijos specialistų; jie nustatė vėluojančius savarankiškumo įgūdžius ir pusiausvyros sutrikimą. 5 metų amžiaus pacientė konsultuota gydytojo vaikų neurologo. Klinikinio neurologinio tyrimo metu nustatytas žemas raumenų tonusas, normali raumenų jėga, gauti simetriškai sumažėję gilieji sausgyslių refleksai. Mergaitė negalėjo paeiti ant kulnų, vaikščiojo palinkusi į priekį ir skundėsi greitu nuovargiu. Dėl dažnų griuvimų kelių srityse oda nubrozdirta ir stebėtos poodinės kraujosruvos. Atlikus ENG tyrimą, nustatyta ryški demielinizacija. Tiriant rankose vidurinio ir alkūninio nervo motorinio atsako amplitudė negauta (0,0 mV), distalinė latencija sulėtėjusi ir laidumo greitis neišmatuojamas. Kojose šėivinio nervo motorinio atsako amplitudė sumažėjusi (0,01 mV), distalinė latencija sulėtėjusi (12 ms) ir sulėtėjęs laidumo greitis (10 m/s). Jutiminių nervų atsakų negauta. Mergaitė atsiųsta gydytojo genetiko konsultacijai dėl įtariamos PN. CMT1A genetinės srities duplikacija nenustatyta. *MPZ* geno tyrimu nustatytas galimai patogeninis heterozigotinis variantas

NM\_000530:c.263A>G (p.(Tyr88Cys)) (žr. 12 pav. a)). Abiem tėvams buvo atliktas *MPZ* geno 3 egzono tyrimas, kurio rezultatai parodė *de novo* varianto kilmę. Šio varianto nėra *1000 Genomes* projekto ir *ExAc* duomenų bazėse. *ClinVar* duomenų bazėje varianto identifikacinis numeris SCV000759644.1. Variantas vertinamas kaip galimai patogeninis remiantis DANN (0,99), GERP (4,69), LRT (0,84), *MutationAssessor* (3,08), *MutationTaster* (1), SIFT (0), *PolyPhen2* (0,99) ir PROVEAN (-7,42) įverčiais (24 lentelė). Apibendrinant šiuos rezultatus teigiame, kad nustatytas *MPZ* geno variantas NM\_000530:c.263A>G (p.(Tyr88Cys)) yra genetinė PN priežastis.

4 metų amžiaus pacientė gimė sveikiems tėvams 39 gestacijos savaitę savaiminio gimdymo metu. Naujagimė pagal Apgar balų skalę įvertinta 9 ir 9 balais pirmą ir penktą minutę po gimimo. Gimus buvo silpnas žindimo refleksas, naujagimė maitinta trumpais intervalais 2 savaites. Vėliau maitinta nutrauktu motinos pienu iš buteliuko, tačiau vieno maitinimo metu suvalgydavo 20 ml pieno. 3 mėn. amžiaus būklė ūmiai pablogėjo, diagnozuota aspiracinė pneumonija. Persirgus pneumonija, pasireiškė progresuojantis kvėpavimo ir rijimo sutrikimas. 4 mėn. amžiaus suformuota tracheostoma ir perkutaninė endoskopinė gastrostoma. Pacientei atlikti atrankiniai biocheminiai genetiniai tyrimai, *SMN1* geno 7 egzono delecijos tyrimas, tačiau ligos priežastis nebuvo nustatyta. Nustatytas normalus kreatinfosfokinazės aktyvumas serume 158 IU/l (normos reikšmė 25–199). Išliekant sunkiai hipotonijai, 7 mėn. amžiaus buvo atliktas skersaruožių skeleto raumenų biopsijos tyrimas (*m. gastrocnemius v. lateralis*), nustatyti nespecifiniai pakitimai, būdingi denervacijai. Objektyvaus neurologinio tyrimo metu nustatyta arefleksija, kelių ir čiurnų sąnarių kontraktūros. Aktyvių / antigravitacinių judesių galūnėse buvo labai mažai, mergaitė nelaikė galvos, pati nečiulpė, nerijo, savarankiškai kvėpavo labai trumpai, neapsivertė. Galvinių nervų sutrikimų nenustatyta. Pacientei esant 21 mėn. amžiaus atlikus ENG tyrimą nustatytas labai sunkus jutiminių ir motorinių nervinių skaidulų pažeidimas: rankose ir kojose jutiminių nervų atsakų negauta, o vidurinio nervo motorinio atsako gautas ilgas distalinis latentinis periodas, trukmė, labai maža amplitudė ir labai lėtas NLG (< 5 m/s), kitų motorinių nervų atsakų negauta. VES tyrimu *MPZ* geno 4-ame egzone nustatyta heterozigotinė delecija NM\_000530.7:c.558delG (p.(Arg186Serfs)), sukianti baltymo skaitymo rėmelio poslinkį. Variantas vertinamas kaip galimai patogeninis remiantis GERP (4,7), *PolyPhen2* (0,97), PROVEAN (-2,124) (žr. 24 lentelę). *ClinVar* duomenų bazėje varianto identifikacinis numeris RCV000578395.1. Nustatyta delecija patvirtinta Sangerio sekoskaitos metodu (žr. 12 pav. b)), o ištyrus abiejų tėvų DNR mėginius patvirtinta *de novo* delecijos kilmė.

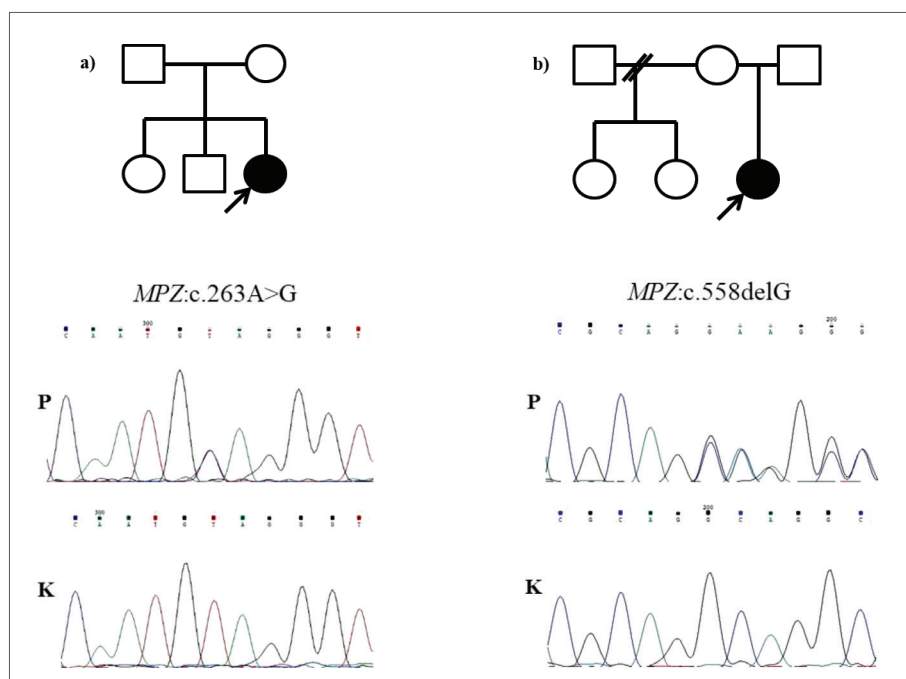
**24 lentelė.** *MPZ* geno variantų charakterizavimas

Variantas	Genotipas	Paieška žmogaus genomo duomenų bazėse <sup>1</sup> : 1000G; ESP; ExAC	<i>In silico</i> analizė <sup>2</sup> : GERP; SIFT; PP2; CADD
NM_000530:c.263A>G (p.(Tyr88Cys))	het	–	4,69; 0*; 0,99*; 25,1*
NM_000530.7:c.558delG (p.(Arg186Serfs))	het	–	4,7; –; 0,97*; –

*Paaiškinimai:* <sup>1</sup>Žmogaus genomo duomenų bazės: varianto alelio dažniai 1000 Genomes projekte (1000G: 2018 m. kovo mėn., <http://www.1000genomes.org/>), egzomų sekoskaitos projektas (ESP: 2015 m. kovo mėn., <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) ir egzomų kaupimo ir saugojimo konsorciumas (ExAC: ver. 0.3.1, <http://exac.broadinstitute.org/>);

<sup>2</sup>*In silico* analizė: GERP (genominės evoliucijos greičio profiliavimo rezultatas, kuo didesnis įvertis, tuo konservatyvesnė sritis, įverčių intervalas nuo –12,3 iki 6,17), SIFT (<http://sift.jcvi.org>), PolyPhen2 (PP2: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) ir CADD (<http://cadd.gs.washington.edu/>) programos;

\* įrodo patogeniškumą.



**12 pav.** Šeimos, kuriose nustatyti nauji *MPZ* geno variantai. a) genealogija, kurioje nustatytas naujas variantas NM\_000530:c.263A>G (p.(Tyr88Cys)), P – paciento ir K – laukinio tipo alelio sekvenogramos fragmentas, b) genealogija, kurioje nustatytas naujas variantas (p.(Arg186Serfs)), P – paciento ir K – laukinio tipo alelio sekvenogramos fragmentas. Sergantys asmenys pažymėti juodos spalvos simboliu, rodyklė iš kairės nurodo probandą.

### 3.2.3.1. *MPZ* geno naujų patogeninių variantų reikšmė

Ištirus 76 CMT sergančių pacientų DNR mėginius, dviem pacientams (2,63 proc.) nustatyti *MPZ* geno patogeniniai variantai. Abu nustatyti *MPZ* geno variantai yra nauji, neaprašyti mokslo literatūroje. Dabartinė *MPZ* geno patogeninių variantų nomenklatūra nėra tiksli, nes pacientai, kurių NLG < 38 m/s, yra priskiriami prie CMT1B potipio, o tie, kurių NLG > 38 m/s, priskiriami prie CMT2I potipio. Nepaisant to, kūdikystės laikotarpiu pasireiškianti sunki neuropatija priskiriama prie *Dejerine–Sottas* sindromo arba diagnozuojama įgimta hipomielinizacija. Klinikiniai simptomai gali pasireikšti dviem būdais – naujagimiams pasireiškia sunki hipotonija, silpnumas ir dažnai vystosi kvėpavimo nepakankamumas, o kitu atveju hipotonija ir judesių raidos vėlavimas pasireiškia kūdikystės laikotarpiu. Anksčiau sunkiai sergantys vaikai, kuriems nustatyti bialeliai AR būdu paveldėti variantai su CMT siejamuose genuose, buvo priskiriami prie *Dejerine–Sottas* sindromo (Dejerine, Sottas, 1893). Vėliau Hardingas ir Thomas (1980) pastebėjo, kad heterogenišką grupę sudaro sunkiai sergantys kūdikiai, kuriems nustatyti *de novo* AD būdu paveldimi genų variantai, pavyzdžiui, *MPZ* (Shy, 2006). O įgimta hipomielinizuojanti neuropatija yra retas PNS mielininio dangalo vystymosi sutrikimas, kuriam būdingas mielino nebuvimas arba ryškus jo sumažėjimas. Šis terminas pagrįstas histologinio tyrimo rezultatais. Kai kurie autoriai siūlo su *MPZ* patogeniniais variantais susijusius fenotipus skirstyti pagal amžių, kuriame pasireiškė neuropatijos požymiai, ligos eigos sunkumą ir fenotipo požymius.

Šiame tyrime naujų *MPZ* geno patogeninių variantų nulemta neuropatija abiem pacientėms pasireiškė skirtingai kūdikystės laikotarpiu ir iliustruoja fenotipinį kūdikystės laikotarpiu pasireiškiančios neuropatijos heterogeniškumą. Pacientei, kuriai nustatyta NM\_000530.7:c.558delG (p.(Arg196Serfs)) delecija, fenotipas pasireiškė gimus raumenų hipotonija ir silpnu čiulpimo refleksu, o pacientei, kuriai nustatytas NM\_000530.7:c.263A>G (p.(Tyr88Cys)) variantas, hipotonija ir vėluojanti judesių raida pasireiškė vėliau kūdikystės laikotarpiu. Abiem vaikams nustatyti elektrofiziologiniai rodikliai, būdingi ryškiam mielinizacijos sutrikimui (NLG < 15 m/s) (Shy, 2006). Tikslios diagnozės nustatymą komplikuoja tai, kad abiem pacientėms nervų biopsijos histologinis tyrimas nebuvo atliktas.

Beveik visos *MPZ* geno pakaitos yra ekstraląsteliniam arba transmembraniniame baltymo domene. Naujai nustatytas p.Tyr88Cys variantas lemia



konservatyvios aminorūgšties pasikeitimą 88 padėtyje iš tirozino į cisteiną kritinėje disulfidinių ryšių srityje ekstraląsteliniam domene (tarp Cys-50 ir Cys-127), kuris atsakingas už adhezines MPZ savybes. *MPZ* geno variantai, kurie lemia kūdikių pradžios neuropatiją, tikėtina, sustabdo mielininio dangalo formavimąsi. T. y. pakitęs baltymas visiškai nepasiekia plazminės membranos, o kaupiasi citoplazmoje ar endoplazminiame tinkle (Grandis et al., 2008). Šią hipotezę patvirtina nervų biopsijos morfologiniai tyrimai, atlikti pacientams, sergantiems kūdikių pradžios neuropatija, rezultatai (Ron, Walter, 2007). Pakaitos, kurios įveda cisteiną į *MPZ* ekstraląstelinę grandinę, sutrikdo disulfidinius ryšius, kurie svarbūs baltymo 3D struktūrai (Shapiro et al., 1996), todėl mielinizacija nevyksta. Eksperimentais įrodyta, kad ektoziniai disulfidiniai ryšiai *trans* konformacijoje sulėtina pirminį mielino susidarymą, kai pelėms sukeliama p.Ser63Cys pakaita (Avila et al., 2010). Kitų autorių duomenimis, p.Arg98Cys pakaita lemia kūdikių pradžios neuropatiją aktyvindama viduląstelinį procesus, o ne mielino susidarymą (Saporta et al., 2012). Remiantis klinikiniais ir ENG tyrimo rezultatais galima teigti, kad mūsų pacientei p.Tyr88Cys pakaita lėmė kūdikių pradžios neuropatiją. Kitai pacientei nustatyta nauja vieno nukleotido delecija NM\_000530.7:c.558delG (p.(Arg196Serfs)), lemianti baltymo skaitymo rėmelio poslinkį, dėl kurio prarandamas originalus baigmės kodonas ir subrendęs baltymas pailgėja dviem aminorūgštimis citoplazminiame domene. Citoplazminio domeno sutrumpėjimas lemia ankstyvos pradžios neuropatiją (Shy et al., 2004). Šiame tyrime naujai nustatyta delecija rodo, kad citoplazminio domeno pailgėjimas taip pat lemia ankstyvos pradžios neuropatiją, kuri pasireiškė pacientei.

Naujų patogeninių variantų identifikavimas plečia žinias apie *MPZ* geno variantų poveikį fenotipui. Šiame tyrime identifikuoti du nauji patogeniniai variantai NM\_000530.7:c.558delG (p.(Arg196Serfs)) ir NM\_000530.7:c.263A>G (p.(Tyr88Cys)) kartu su išsamiu klinikiu aprašymu išplečia žinias apie *MPZ* ekstraląstelinio ir citoplazminio domeno variantų fenotipinę įvairovę ir pabrėžia kitų moduliacinių veiksnių įtaką ligos eigai.

### 3.2.4. *MFN2* geno tyrimas ir fenotipo įvertinimas

*MFN2* geno Sangerio sekoskaita atlikta 54 pacientams, iš jų 34 buvo priskirti CMT2 tipui ir 18 CMT-I tipui. Tik vienai pacientei (1,85 proc.; 1/54) identifiukuotas patogeninis variantas.



Dvidešimt devynerių metų amžiaus pacientė konsultuota Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Medicininės genetikos centre siekiant nustatyti paveldimosios motorinės ir sensorinės neuropatijos etiologiją.

Pacientė yra trečias vaikas šeimoje, abu tėvai ir vyresni sibsai sveiki. Sumažėjęs raumenų tonusas buvo pastebėtas pirmais gyvenimo mėnesiais. Ankstyvoji judesių raida vėlavo, mergaitė pradėjo vaikščioti vėliau, palyginti su bendraamžiais, greitai pavargdavo. Pradėjusi lankyti mokyklą, sunkiai bėgiojo ir lėčiau sportavo kūno kultūros pamokose.

Dvylikos metų amžiaus negalėjo stovėti ant kulnų, gulint pėdos buvo nukarusios, negalėjo jų pakelti prie blauzdų priekinių paviršių, formavosi *cavus* deformacija, dažnai kartojosi skausmingi, nevalingi raumenų susitraukimai. Tuo metu mergaitei, klinikinių ir elektrofiziologinių tyrimų duomenimis, buvo diagnozuota paveldimoji motorinė ir sensorinė neuropatija.

Būdama 25 metų amžiaus pacientė pirmą kartą kreipėsi dėl CMT diagnozės patvirtinimo. Ji skundėsi blogėjančia judėjimo funkcija: buvo sunku lipti laiptais aukšty, negalėjo stovėti pasistiebusi ir ant kulnų, atsitūpti ištiestomis pėdomis, negalėjo bėgti ir vaikščiojo aukštai keldama kojas. Skundėsi kelesius metus silpnėjančia rankų jėga, mažėjančia rankų apimtimi ir tirpimu. Kaip ir anksčiau, vargino nevalingi, skausmingi raumenų susitraukimai. Pacientei buvo atliktas CMT1A geno srities, apimančios *PMP22* geną, delecijų ir duplikacijų tyrimas, vėliau *GJB1* ir *MPZ* genų sekoskaita, bet molekulinė ligos priežastis nenustatyta.

29 metų pacientei objektyvaus neurologinio tyrimo metu nustatytas nedidelis plaštakų paviršinio jutimo sutrikimas ir pasireiškianti kojų hipestezija žemiau kelių, sutrikęs vibracijos jutimas distaliau čiurnų bei kojų padėties jutimas. Sausgyslių refleksai simetriški, rankų – vidutiniai, kelių refleksai neišgauti abipus, Achilo sausgyslės – labai menki abipus. Užfiksuota pasireiškianti kojų raumenų atrofija, labiausiai distalinėse dalyse, pėdų deformacija (*pes cavus*). Pacientė negalėjo paeiti ant pirštų bei kulnų, sunkiai atsistojo iš tupimos padėties. Rankų raumenų jėga įvertinta 5 balais iš 5, kojų proksimalinių raumenų jėga – 4 balais, distalinių – 3 balais iš 5. Pacientė buvo siūsta atlikti ENG (žr. 25 lentelę) ir EMG tyrimų.

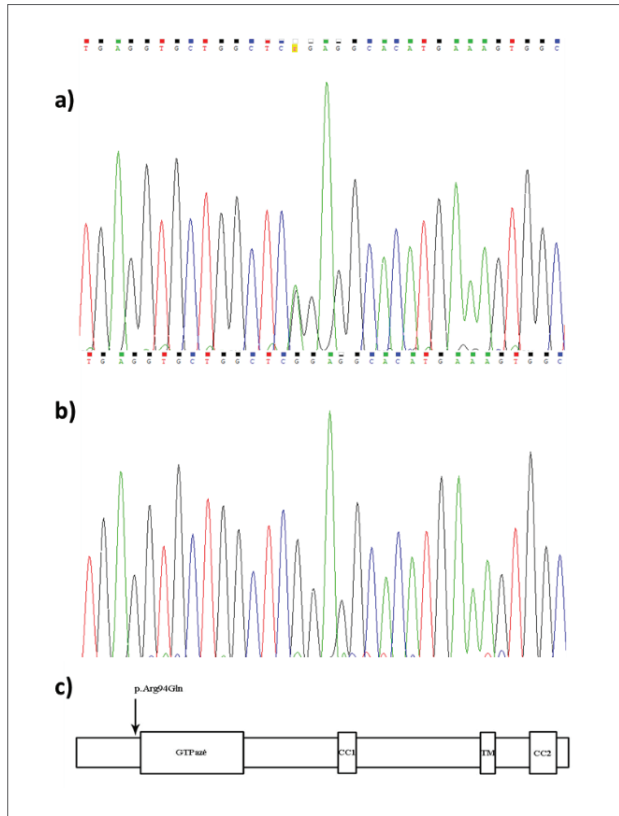
**25 lentelė.** Elektroneurografijos rezultatai

		Pacientės nervų rodiklių vertės			Normaliosios vertės		
		Amplitudė (mV ar $\mu$ V)	DL (ms)	NLG (m/s)	Amplitudė	DL (ms)	NLG (m/s)
Motoriniai nervai	Vidurinis	8,75	3,96	54,3	3,9	3,9	48,4
	Alkūninis	7,35	2,74	50,0	4,8	3,7	49,9
	Šeivinis (deš.)	0,66	3,80	37,4	3,0	3,9	40,3
	Šeivinis (kair.)	2,97	4,30	41,1			
	Blauzdinis (deš.)	9,92	3,3	41,1	3,8	4,3	40,0
	Blauzdinis (kair.)	9,51	2,90	37,2			
Jutiminiai nervai	Vidurinis	10,7	4,60	38,0	15,1	3,7	48,1
	Alkūninis	Atsako neišgauta			12,5	3,5	47,7
	Blauzdos odos	Atsakų neišgauta abipus			7,1	–	39,7

*Paaiškinimai.* Normaliosios vertės nustatytos Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų neurofiziologijos laboratorijoje pagal sveikų asmenų tyrimų rezultatus, vertinant vidurkį ir 2 standartinius nuokrypius. Amplitudės ir NLG pažeidimu laikoma, jei rodiklio vertė mažesnė nei normalioji vertė; DL pažeidimu laikoma, jei rodiklio vertė didesnė nei normalioji vertė; deš. – dešinė; kair. – kairė; mV – milivoltai, nurodytos motorinių atsakų amplitudės;  $\mu$ V – mikrovoltai, nurodytos juntamųjų atsakų amplitudės; DL – distalinis latentinis periodas; ms – milisekundės; NLG – nervinio impulso laidumo greitis; m/s – metrai per sekundę.

ENG tyrimo metu nustatytas aksoninio tipo nervinių skaidulų pažeidimas: kojose abipus sumažėjusios šeivinio nervo motorinių atsakų amplitudės esant normaliems ar mažai pakitusiems latentiniams periodams bei impulso plitimo greičiams ir neišgauti juntamųjų nervų (blauzdos odos nervo abipus) atsakai. Rankų nervų pakitimai menkesni nei kojų: registruoti šiek tiek pakitę vidurinio ir alkūninio nervų motoriniai atsakai, alkūninio nervo juntamojo atsako neregistruota, o vidurinio nervo juntamojo atsako amplitudė sumažėjusi. EMG tyrimas atliktas adatiniais elektrodais, tirti rankų ir kojų raumenys. Raumenų pataloginio savaiminio aktyvumo, rodančio aktyvios denervacijos požymius, neregistruota. Vyraavo reikšmingai padidėjusios amplitudės ir pailgėję motorinio vieneto veikimo potencialai, rodantys pasireiškiančią lėtinę reinervaciją. Įvertinus ENG ir EMG tyrimų rezultatus nustatyta aksoninė motorinė ir sensorinė rankų ir kojų polineuropatija, lėtinė, neaktyvios eigos, su galūnių raumenų reinervacijos požymiais.

MFN2 geno tyrimu, atliktu Sangerio sekoskaitos metodu, nustatytas heterozigotinis patogeninis *missense* variantas NM\_014874.3:c.281G>A (p.(Arg94Gln)) (žr. 13 pav.).



**13 pav.** *MFN2* sekvenogramos: a – pacientės *MFN2* sekvenogramos fragmentas; b – laukinio tipo alelis; c – *MFN2* baltymo struktūra; nustatytas patogeninis variantas pažymėtas rodykle

#### 3.2.4.1. *MFN2* genotipo ir fenotipo sąsajos

Ankstyva pacientės liga ir normalūs ar šiek tiek sulėtėję nervinio impulso laidumo greičiai buvo indikacija kaip pirmo pasirinkimo geną tirti *MFN2* geną (Saporta et al., 2011). Remdamiesi CMT genetinių tyrimų strategija (Ostern et al., 2013), pirmiausia atlikome CMT1A genomo srities delecijos ir (arba) duplikacijos tyrimą, nes anksčiau atlikto elektrofiziologinio tyrimo rezultatai buvo nepakankamai informatyvūs. Nustatę normalų vidurinio nervo motorinių skaidulų nervinio impulso laidumo greitį (54,3 m/s), atvejį priskyrėme prie CMT2 fenotipų.

Heterozigotinis *missense* patogeninis variantas NM\_014874.3:c.281G>A (p.(Arg94Gln)) pirmą kartą CMT pacientų grupėje aprašytas 2004 metais (Zuchner et al., 2004). Šis patogeninis variantas lemia aminorūgšties arginino pakaitą 94-oje padėtyje ir žymi numanomą GTPazės domeno pradžią. Jaut-

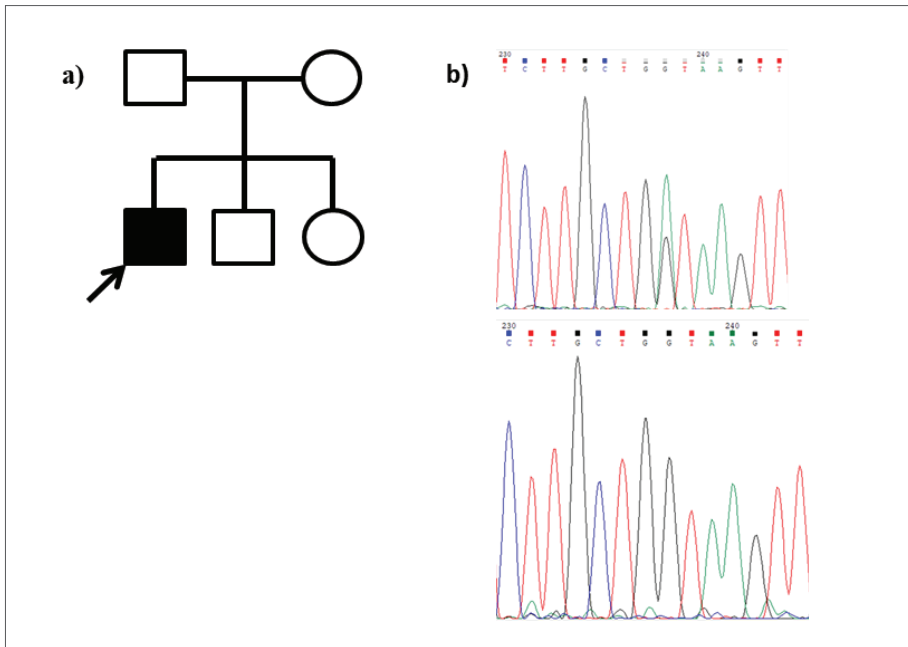
riausia restruktūrizacijai, įvykus patogeniniam sekos pokyčiui, MFN2 baltymo aminorūgšties liekana yra 94-oje G1 subdomeno P kilpos padėtyje. Skirtingų autorių grupės aprašė šio kodono patogeninius variantus p.Arg94Trp ir p.Arg94Gln (Ando et al., 2017; Cho et al., 2007; Zuchner, Vance, 2006). Ši padėtis yra iš karto prieš GTPazės sritį ir manoma, kad ji yra DNR sekoje, kurioje labiausiai tikėtina, kad įvyks pakaita. Beveik visiems pacientams nustatyti *MFN2 missense* patogeniniai variantai GTPazės srityje (> 50 proc.) arba spiralinės ritės struktūroje. Šiuo metu Žmogaus genomo mutacijų duomenų bazėje (HGMD<sup>®</sup>) nurodyta per 200 *MFN2* geno mutacijų. Kai kurie patogeniniai variantai sukelia funkcijos padidėjimą, todėl tokie pakitę baltymai linkę kauptis mitochondrijose. Kiti patogeniniai variantai sukelia funkcijos praradimą ir lemia susilpnėjusią mitochondrijų sintezę. p.Arg94Gln patogeninis variantas aprašomas daugelyje tyrimų ir yra siejamas su ankstyvais (simptomų pradžia iki 10 metų amžiaus) sunkiais CMT fenotipais. Pacientai, kuriems pasireiškia sunkus fenotipas, judėjimo funkciją praranda per pirmus 30 gyvenimo metų (Bombelli et al., 2014). Pacientės fenotipą vertiname kaip vidutinio sunkumo: judėjimo funkcija nėra smarkiai sutrikusi ir jai nereikalingos ortopedijos priemonės. Skirtingai nuo pirmą kartą Züchnerio ir bendraautorį aprašyto paciento, mūsų pacientei regos nervų atrofija nenustatyta. Vėliau aprašytų pacientų tyrimų duomenimis, p.Arg94Gln patogeninis variantas siejamas tik su izoliuota neuropatija. *MFN2* patogeniniai variantai, susiję su funkciniu GTPazės domenu, dažniau pasireiškia sunkiais daugelio organizmo sistemų sutrikimais (Rouzier et al., 2012). Aprašomai pacientei kitų sisteminių sutrikimų nediagnozuota, todėl jos liga atitinka grynos motorinės neuropatijos fenotipą. Šalčio sukelti raumenų spazmai – dažnai aprašomas CMT pacientams būdingas požymis. Šiame tyrime aprašomai pacientei nuo vaikystės taip pat pasireiškė skausmingi, nevalingi raumenų susitraukimai.

Išsamiai išnagrinėję 27 CMT2A pacientų fenotipą, S. M. Feely ir bendra autoriai nustatė, kad dažniausiai jie serga sunkia motorine neuropatija, nes 11-ai pacientų buvo nustatyta gryna motorinė neuropatija, kartais – su ryškiai giliųjų jutimų sutrikimu ar praradimu (Feely et al., 2011). Siekdami paaiškinti sunkią neuropatiją, autoriai teigia, kad funkciniu požiūriu svarbių sričių patogeniniai variantai gali pasireikšti „dominuojančiu neigiamu“ poveikiu, kuris taip pat sutrikdo normalią, laukinio tipo alelio, *MFN2* funkciją. Lengva ligos forma sergantys pacientai, kurių šiame tyrime buvo itin mažai, gali turėti kitų *MFN2* sričių pokyčius, kurie tik iš dalies daro įtaką *MFN2* funkcijai arba nedaro didelės žalingos įtakos laukinio tipo aleliui.

### 3.2.5. *PMP22* geno tyrimas ir fenotipo įvertinimas

*PMP22* geno Sangerio sekoskaitos tyrimas atliktas 31 pacientui (15 CMT1 ir 16 PNSP). Vienam pacientui (3,22 proc.; 1/31) nustatytas patogeninis variantas 4-ame introne NM\_000304.3:c.319+1G>A, kuris anksčiau aprašytas kitų autorių tyrimuose.

Šiam 22 metų amžiaus pacientui nuo 16 metų amžiaus pasireiškė eisenos sutrikimai. Pacientas teigė, kad po ilgesnio fizinio krūvio pasireiškė kojų silpnumas, tirpo dešinė ranka ir koja. Eisenos sutrikimai progresavo, vyras negalėjo atsitūpti, pasistiebt, eiti ant kulnų, sunkiai lipo laiptais aukštyn, pasireiškė jutimų sutrikimas pėdose. Skundėsi kelerius metus mažėjančia rankų ir kojų apimtimi ir tirpimu. Pacientas vartojo įvairius maisto papildus, tačiau raumenų atrofiija ir silpnumas progresavo. Abu paciento tėvai ir jaunesni sibsai sveiki. 20 metų amžiaus pacientui galvinių nervų tyrimas parodė horizontalų nistagmą. Objektivaus neurologinio tyrimo metu nustatytas plaštakų paviršinio jutimo sutrikimas ir kojų hipestezija žemiau kelių, labiau išreikšta kairėje, palyginti su dešine, sutrikęs vibracijos jutimas distaliau čiurnų bei kojų padėties jutimas. Sausgyslių refleksai simetriški, rankų – vidutiniai, kelių ir Achilo sausgyslės refleksai neišgauti abipus. Užfiksuota pasireiškianti rankų ir kojų raumenų atrofiija, labiausiai distalinėse dalyse, pėdų deformacija (*pes cavus*). Paciento rankų raumenų jėga įvertinta 5 balais iš 5, kojų proksimalinių raumenų jėga – 4 balais, distalinių – 0 balų iš 5. ENG tyrimu nustatytas demielinizuojančio tipo nervinių skaidulų pažeidimas: kojose abipus šėivinio nervo motorinių atsakų ir juntamųjų nervų atsakų negauta, o rankose motorinių ir juntamųjų nervų sumažėjusios amplitudės esant labai pailgėjusiems latentiniams periodams bei labai sulėtėjusiems impulso plitimo greičiams. Pacientui buvo atliktas CMT1A genomo srities, apimančios *PMP22* geną, delecijų ir (arba) duplikacijų tyrimas, vėliau *GJB1* ir *MPZ* genų sekoskaita, bet molekulinė ligos priežastis nenustatyta. *PMP22* geno tyrimu, atliktu Sangerio sekoskaitos metodu, nustatytas heterozigotinis patogeninis variantas NM\_000304.3:c.319+1G>A (žr. 14 pav.).



**14 pav.** a) genealogija; rodykle pažymėtas sergantis pacientas, b) *PMP22* geno sekvenogramos: viršuje – paciento sekvenogramos fragmentas; apačioje – laukinio tipo alelio sekvenogramos fragmentas

### 3.2.5.1. *PMP22* genotipo ir fenotipo rezultatų aptarimas

Šiame tyrime nustatytas CMT1 tipą lemiantis variantas, kurio patogeniškumą anksčiau aprašė kelios skirtingos autorių grupės, dvi iš jų – Azijos sergančiųjų grupėse (Liao et al., 2017; Nelis et al., 1994; Numakura et al., 2002). Variantas nustatytas akivaizdžiai atsitiktiniam pacientui, kurio šeimos narių DNR mėginiai buvo neprieinami varianto segregacijos analizei. Y. C. Liao ir bendraautorė (2017) aprašytai pacientei, kuriai nustatytas *de novo* variantas c.319+1G>A, CMT simptomai pasireiškė iki 20 metų amžiaus, panašiai kaip ir mūsų pacientui, tačiau buvo žymiai menkiau išreikšti. Pirmieji simptomai taip pat skyrėsi, nes mūsų pacientui jie pirmaisia pasireiškė kojų silpnumu ir sutrikusia eiseną, o minėtų autorių pacientei – kairės rankos pirštų nejudrumu ir sutrikusia eiseną, o minėtų autorių pacientei – kairės rankos pirštų nejudrumu ir sutrikusia eiseną, o minėtų autorių pacientei – kairės rankos pirštų nejudrumu ir sutrikusia eiseną. Nepaisant to, asimetrija stebėta ir šiam pacientui, kadangi jis nurodė skirtingą jutimų sutrikimą galūnėse. Skirtumo tarp abiejų pacientų ENG tyrimų rezultatų beveik nebuvo; ENG tyrimu abiem nustatytas ryškus demielinizuojančio tipo nervinių skaidulų pažeidimas.

*PMP22* geno taškiniai variantai retai nustatomi CMT sergantiems pacientams (Fridman et al., 2015). Tikslų *PMP22* geno taškinių variantų dažnio

įvertinimą mūsų pacientų grupėje riboja tai, kad tyrimas nebuvo atliktas visiems pacientams, kurie buvo priskirti CMT1 ir CMT-T tipams.

### 3.2.6. Mitochondrinės DNR *MT-ATP6/8* genų tyrimai *Charcot–Marie–Tooth* liga sergantiems pacientams

Standartinė PGR reakcija buvo atlikta pagausinti persidengiančius genus *MT-ATP6/8* 49 CMT sergantiems pacientams. Pacientai, kurių genealogijose buvo aiškus paveldėjimas per tėvo liniją sūnums, į tyrimą įtraukti nebuvo. Prieš tai visiems pacientams buvo atliktas CMT1A genetinės srities, apimančios *PMP22* geną, delecijų ir (arba) duplikacijų tyrimas. Vėliau atliktas *GJB1*, *MPZ* ir *MFN2* genų tyrimas. Iš šių pacientų 34 buvo priskirti CMT2, 15 – CMT-T tipams. Šioje grupėje nė vienam pacientui nebuvo nustatyta patogeninių *MT-ATP6/8* genų variantų. Kadangi mitochondrijų genomui būdingas variabilumas, visiems pacientams šiame tyrime nustatyti nepatogeniniai pokyčiai (žr. 26 lentelę).

**26 lentelė.** *MT-ATP6/8* variantų, nustatytų 49 CMT pacientų grupėje, sąrašas

Variantas	Pacientų skaičius	Būklė
<i>CO2:m.8167T&gt;C (p.(Gly194=))</i>	1	homoplazmija
<i>CO2:m.8251G&gt;A (p.(Gly222=))</i>	2	homoplazmija
<i>NC7:m.8270_8278delCACCCCTC</i>	1	homoplazmija
<i>NC7:m.8289_8290insCCCCCTCTA</i>	2	homoplazmija
<i>ATP8:m.8395C&gt;T (p.(Pro10=))</i>	1	homoplazmija
<i>ATP8:m.8410C&gt;T (p.(Pro15=))</i>	1	homoplazmija
<i>ATP8:m.8422A&gt;G (p.(Thr19=))</i>	1	homoplazmija
<i>ATP8:m.8464C&gt;T (p.(Tyr33=))</i>	1	homoplazmija
<i>ATP8:m.8472C&gt;T (p.(Pro36Leu))</i>	1	homoplazmija
<i>ATP8:m.8473T&gt;C (p.(Pro36=))</i>	1	homoplazmija
<i>ATP8:m.8512A&gt;G (p.(Lys49=))</i>	1	homoplazmija
<i>ATP6:m.8610T&gt;C (p.(Pro28=))</i>	2	homoplazmija
<i>ATP6:m.8697G&gt;A (p.(Met57=))</i>	5	homoplazmija
<i>ATP6:m.8715T&gt;C (p.(Thr63=))</i>	1	homoplazmija
<i>ATP6:m.8818C&gt;T (p.(Leu98=))</i>	1	homoplazmija
<i>ATP6:m.8825T&gt;C (p.(Met100Thr))</i>	1	homoplazmija
<i>ATP6:m.8836A&gt;G (p.(Met104Val))</i>	1	homoplazmija
<i>ATP6:m.8860A&gt;G (p.(Thr112Ala))</i>	49	homoplazmija
<i>ATP6:m.8994G&gt;A (p.(Leu156=))</i>	2	homoplazmija
<i>ATP6:m.9055G&gt;A (p.(Ala177Thr))</i>	2	homoplazmija
<i>ATP6:m.9123G&gt;A (p.(Leu199=))</i>	1	homoplazmija
<i>ATP6:m.9614T&gt;C (p.(Leu30=))</i>	2	homoplazmija

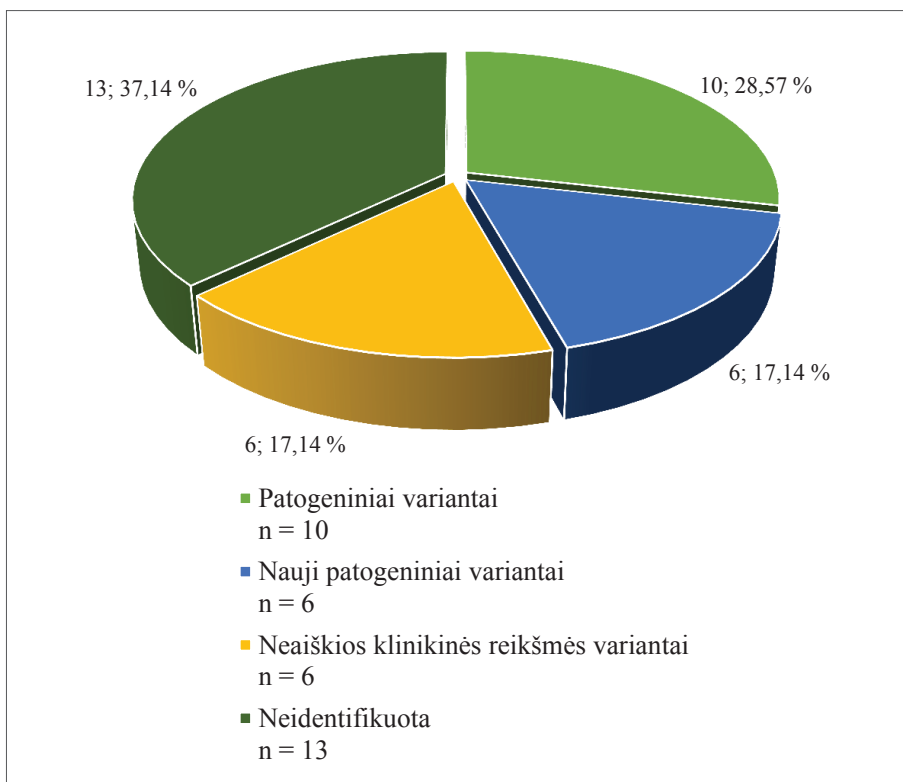
### 3.2.6.1. *MT-ATP6/8* genų patogeniniai variantai – reta *Charcot–Marie–Tooth* ligos priežastis

Originalus Didžiosios Britanijos mokslininkų grupės tyrimas parodė, kad *MT-ATP6* geno patogeninis variantas m.9185T>C lemia CMT2 tipą ir sudarė 1,1 proc. (n = 442) (Pitceathly et al., 2012). Kadangi tyrimo imtis, palyginti su šio tyrimo imtimi, buvo beveik 10 kartų didesnė, o nustatytos molekulinės priežasties dažnumas palyginti labai žemas, akivaizdu, kad mūsų tyrimas panašaus rezultato negalėjo pakartoti. Tai patvirtina, kad *MT-ATP6* geno patogeniniai variantai yra reta CMT2 priežastis. Kitame tyrime vienoje CMT šeimoje identifikuotas m.9176T>C variantas (Synofzik et al., 2012), taigi *MT-ATP6* geno tyrimas turi būti pasirenkamas, ypač jei genealogijoje akivaizdus motininis paveldėjimas.

### 3.2.7. Naujos kartos sekoskaitos tyrimo efektyvumas paveldimų neuropatijų grupėje

Šiame darbe analizavome 34 CMT sergančius pacientus ir įvertinome tikslinio su CMT siejamų genų rinkinio efektyvumą taikant NKS. Tiriamųjų grupę sudarė 34 pacientai, kuriems nenustatyta genetinės srities, apimančios *PMP22* geną, duplikacija, *MPZ*, *MFN2* ir *GJB1* genų patogeniniai variantai Sangerio sekoskaitos metodu. Pacientų atranka buvo pagrįsta individualiu vertinimu, kuris apėmė genealogijų duomenis, klinikinio neurologinio tyrimo rezultatus ir NLG tyrimo rezultatus. Tikintis nustatyti AR būdu paveldėtus patogeninius variantus, atrinkti visi pacientai, kuriems pasireiškė ankstyvos pradžios ir sunkios eigos fenotipas, skoliozė, pėdų deformacijos ir kiti lydintys simptomai. Kitiems pacientams buvo įtartas AD paveldėjimas. NKS tyrimo grupėje atrinkti 25 (73,53 proc.; 25/34) pacientai, kuriems klinikiškai nustatytas CMT2 tipas, nes, atlikus atskirų dažniausiai su CMT siejamų genų tyrimus, šioje grupėje genetinės etiologijos dažnis buvo mažiausias. Penki (14,71 proc.; 5/34) ir keturi (11,76 proc.; 4/34) pacientai buvo priskirti atitinkamai CMT-T ir CMT1 tipams. Moterų ir vyrų santykis buvo 0,89. Vidutinis amžius, kai diagnozuota CMT, buvo  $26,79 \pm 17,46$  metų. Vidutinis amžius, kai pasireiškė pirmieji simptomai, buvo  $20,26 \pm 17,63$  metų. Pagrindiniai pirmieji simptomai – eisenos sutrikimai ir pėdų deformacijos. NKS rezultatai buvo suskirstyti į kelias grupes. Vieną grupę sudarė pacientai, kuriems identifikuoti patogeniniai arba galimai patogeniniai variantai. Kitą grupę sudarė pacientai, kuriems genetinė priežastis nenustatyta. Trečią grupę sudarė pacientai, kuriems nustatytas nežinomos klinikinės reikšmės variantas, kuris apima kelis





**15 pav.** Tikslinio genų rinkinio NKS rezultatų pasiskirstymas

aspektus. Pirmą, yra nežinomos klinikinės reikšmės variantas, kuris nekelia abejonų, kad jis iš tiesų yra patogeninis. Antra, klinikinės reikšmės variantas gali prisidėti prie ligos išsivystymo, tačiau nevisiškai atitinka paciento fenotipą. Trečia, klinikinės reikšmės variantas yra heterozigotinis variantas pacientui, kuriam neabejotinai įtariamas AR paveldėjimas, tačiau antras variantas nebuvo nustatytas. Tikslinio genų rinkinio NKS tyrimo rezultatų analizė parodė, kad patogeniniai ar tikėtini patogeniniai variantai nustatyti 29,41 proc. (10/34), nauji patogeniniai variantai – 17,65 proc. (6/34), neaiškios klinikinės reikšmės variantai – 17,65 proc. (6/34) pacientų (žr. 15 pav.). Patogeniniai, naujai identifikuoti patogeniniai ir neaiškios klinikinės reikšmės variantai pateikti 27 lentelėje. Genai, kuriuose nustatyti patogeniniai ir tikėtini patogeniniai variantai: *GJB1* (1 pacientas), *HINT1* (3 pacientai), *PMP22* (1 pacientas), *BSCL2* (2 pacientai), *GDAP1* (1 pacientas), *TRPV4* (1 pacientas), *DNM2* (1 pacientas). Genai, kuriuose nustatyti nauji patogeniniai variantai: *AARS* (1 pacientas), *ATAD3A* (1 pacientas), *MARS* (1 pacientas), *DCTN1* (1 pa-

cientas), *GBN4* (1 pacientas), *LITAF* (1 pacientas). Genai, kuriuose nustatyti neaiškios klinikinės reikšmės variantai: *ARHGGEF10* (2 pacientai), *ATAD3A* (1 pacientas), *EGR2* (1 pacientas), *HINT1* (1 pacientas), *TRPV4* (1 pacientas). Tikslinio 150 genų rinkinio NKS tyrimo teigiami diagnostiniai rezultatai šioje pacientų grupėje sudarė 44,12 proc. (15/34), tačiau šiek tiek daugiau nei pusei pacientų molekulinė CMT priežastis liko nenustatyta. *GJB1* geno patogeninis variantas NM\_001097642.2:c.34G>A (p.(Gly12Ser)) nebuvo nustatytas Sangerio sekoskaitos metodu.

**27 lentelė.** Tikslinio genų rinkinio NKS gautų variantų charakterizavimas

Variantas	Geno- tipas	Paieška žmogaus genomo duomenų bazėse <sup>1</sup> : 1000G; ESP; ExAC	<i>In silico</i> analizė <sup>2</sup> : GERP; SIFT; PP2; CADD
<b>Patogeniniai / tikėtini patogeniniai variantai</b>			
NM_001122955.3( <i>BSCL2</i> ):c.455A>G (p.(Asn152Ser))	htz	–	5,63; 0*; 1*; 34*
NM_001005361( <i>DNM2</i> ): c.1609G>A (p.(Gly537Ser))	htz	–	5,36; 0,06*; 0,99*; 27,4*
NM_018972.2( <i>GDAP1</i> ): c.844C>T (p.(Arg282Cys))	hmz	–	4,99; 0*; 1*; 35*
NM_000166.5( <i>GJB1</i> ): c.34G>A (p.(Gly12Ser))	htz	–	4,36; 0*; 0,99*; 25,6*
NM_005340.6( <i>HINT1</i> ): c.110G>C (p.(Arg37Pro))	hmz; htz	0,0002; 0,0001; 0,0001	–0,93; 0,02*; 0,115; 23,3*
NM_000304.3( <i>PMP22</i> ): c.353C>T (p.(Thr118Met))	htz	0,0008; 0,0053; 0,0029	5,15; 0*; 1*; 28,8*
NM_021625.4( <i>TRPV4</i> ): c.68G>A (p.(Ser23Asn))	htz	–	3,62; 0,01*; 0,12; 17,05
<b>Nauji patogeniniai / tikėtini patogeniniai variantai</b>			
NM_018188.3( <i>ATAD3A</i> ): c.556C>T (p.(Arg186Trp))	htz	–; 0,0001; 0,00004	3,87; 0*; 1*; 34*
NM_001605.2( <i>AARS</i> ): c.1643T>C (p.(Leu548Pro))	htz	–	6,15; 0*; 0,93*; 31*
NM_004082( <i>DCTN1</i> ): c.1295C>G (p.(Ala432Gly))	htz	–	5,65; 0,01*; 1*; 27,9*
NM_021629( <i>GBN4</i> ): c.847C>T (p.(Arg283Cys))	htz	–	4,51; 0,01*; 0,99*; 35*
NM_004990.3( <i>MARS</i> ):c.1340G>A (p.(Ser447Asn))	htz	–	3,88; 0*; 0,948*; 23,7*
NM_001136472.1( <i>LITAF</i> ):c.418G>A (p.(Ala140Thr))	htz	–; –; 0,00001	5,01; 0,03*; 0,64; 27,1*

Variantas	Genotipas	Paieška žmogaus genomo duomenų bazėse <sup>1</sup> : 1000G; ESP; ExAC	<i>In silico</i> analizė <sup>2</sup> : GERP; SIFT; PP2; CADD
<b>Neaiškios klinikinės reikšmės variantai</b>			
NM_014629.3 ( <i>ARHGEF10</i> ):c.2197C>T (p.(His733Tyr))	htz	0,001; 0,0016; 0,001	3,95; 0,03*; 0,76*; 23,1*
NM_014629.2( <i>ARHGEF10</i> ):c.2456T>C (p.(Val819Ala))	htz	0,0002; –; 0,0001	–0,02; 0,02*; 0,12; 12,9
NM_018188.4( <i>ATAD3A</i> ): c.1847A>T (p.(Lys616Met))	htz	0,0017; –; 0,0034	2,75; 0,02*; 0,99*; 23,7*
NM_000902.3( <i>MME</i> ): c.157G>A (p.(Asp53Asn))	htz	–; 0,0001; 0,0002	5,24; 0,43; 0,01; 18,72
NM_005340.6( <i>HINT1</i> ): c.299A>G (p.(Glu100Gly))	htz	–	3,52; 0,04*; 0,19; 24,9*
NM_021625.4( <i>TRPV4</i> ): c.2518G>A (p.(Glu840Lys))	htz	0,0024; 0,0095; 0,0053	5,39; 0,01*; 0,11; 26,8*

*Paaikškinimai*: Genotipas: hmz – homozigotinis, htz – heterozigotinis; <sup>1</sup>Žmogaus genomo duomenų bazės: varianto alelio dažniai *1000 Genomes* projekte (1000G: 2018 m. kovo mėn., <http://www.1000genomes.org/>), egzomų sekoskaitos projektas (ESP: 2015 m. kovo mėn., <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) ir egzomų kaupimo ir saugojimo konsorciumas (ExAC: ver. 0.3.1, <http://exac.broadinstitute.org/>);

<sup>2</sup>*In silico* analizė: GERP (genominės evoliucijos greičio profiliavimo rezultatas, kuo didesnis įvertis, tuo konservatyvesnė sritis, įverčių intervalas nuo –12,3 iki 6,17), SIFT (<http://sift.jcvi.org>), PolyPhen2 (PP2: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) ir CADD (<http://cadd.gs.washington.edu/>);

\* įrodo patogeniškumą.

## Patogeniniai variantai

### *PMP22*

38 metų amžiaus pacientei palaipsniui nutirpo kojų pirštai, kojos iki blauzdų vidurinio trečdaliao, eisena tapo nestabili, pasireiškė pėdų skausmas. Simptomai palaipsniui progresavo ir per pusę metų išsivystė distalinių kojų dalių silpnumas. Klinikinio neurologinio tyrimo metu nustatyta pasireiškianti kojų hipestezija žemiau kelių, sutrikęs vibracijos jutimas distaliau čiurnų bei kojų padėties jutimas. Gilieji sausgyslių refleksai simetriški, rankose žemi, kelių refleksai labai žemi abipus, Achilo sausgyslių refleksų negauta. Pacientė negalėjo paeiti ant pirštų bei kulnų, sunkiai atsistojo iš tupimos padėties. Rankų raumenų jėga įvertinta 5 balais iš 5, kojų proksimalinių raumenų jėga – 5 balais, distalinių – 3 balais iš 5. ENG tyrimo metu nustatytas demielinizuojan-

čio tipo sensorinių nervinių skaidulų pažeidimas: kojose abipus reikšmingai sumažėjusios paviršinio šėivinio nervo jutiminių atsakų amplitudės esant pailgėjusiems latentiniams periodams bei reikšmingai sulėtėjusiems impulso plitimo greičiams ir neišgauti jutiminių nervų (blauzdos odos nervo abipus) atsakai. Laboratoriniai kraujo ir nugaros smegenų skysčio tyrimai pakitimų nenustatė, taip pat kaip ir nugaros bei galvos smegenų MRT tyrimai. Siekiant identifikuoti uždegiminę šėivinio nervo demielinizuojančią neuropatiją buvo atlikta kairiojo šėivinio nervo biopsija, kuri parodė normalią mielino struktūrą. Uždegiminių ląstelių nebuvo nustatyta. CMT1A genetinės srities duplikacija ir (ar) delecija nebuvo nustatyta. Atlikus NKS tyrimą, nustatytas mokslo literatūroje aprašytas *PMP22* geno heterozigotinis patogeninis variantas NM\_000304.3:c.353C>T (p.(Thr118Met)). Kituose rinkinio genuose šiai pacientei patogeninių variantų nebuvo nustatyta.

### *HINT1*

Pacientui nuo 8 metų amžiaus pasireiškė pėdų silpnumas, pasikeitė eiseną, o vėliau atsirado dizartrią ir disfagią. Klinikinio neurologinio tyrimo metu, kuris atliktas pacientui esant 18 metų amžiaus, nustatyta pėdų hipestezią. Gilieji sausgyslių refleksai simetriški, rankose labai žemi, kelių ir Achilo sausgyslių refleksų negauta. Raumenų jėgą rankose normali, o distaliai kojose įvertinta 3 balais iš 5. Nustatyta rankų ir kojų raumenų atrofija, labiausiai pasireiškianti distalinėse dalyse, pėdų deformacią (*pes cavus*). ENG tyrimu nustatytas aksoninio tipo motorinių ir sensorinių nervinių skaidulų pažeidimas: rankose vidurinio ir alkūninio nervo dešinėje motorinio atsako amplitudė normali, distalinė latencija pailgėjusi esant normaliems laidumo greičiams, sensorinio atsako amplitudė sumažėjusi, distalinė latencija pailgėjusi, laidumo greitis nepakitęs, o kojose šėivinio ir blauzdos nervo abipus motorinio atsako amplitudė labai sumažėjusi (0,77 mV), distalinė latencija pailgėjusi (8,4 ms), laidumo greitis sulėtėjęs (35,9 m/s), neišgauti jutiminių nervų (blauzdos odos nervo abipus) atsakai. EMG tyrimu tirtuose rankų ir kojų raumenyse registruoti neurogeninio tipo pažeidimui būdinga vyraujanti lėtinė reinervacią. Blauzdų raumenyse užfiksuoti vidutinio gausumo aukšto dažnio iškrūviai, būdingi pseudomiotonijai, ir nedaug fibriliacijų. Atlikus NKS tyrimą, nustatytas *HINT1* geno homozigotinis patogeninis variantas NM\_005340.6:c.110G>C (p.(Arg37Pro)).

12 metų amžiaus pacientui pirmieji simptomai pasireiškė nuo 5 metų amžiaus, kai pasikeitė eiseną, pradėjo kliūti kojos, jis ėmė griuvinėti. Vėliau ligai progresuojant ryškėjo kojų deformacią, pasireiškė rankų ir kojų raumenų

sąstingis, vaikas skundėsi nuovargiu po fizinio krūvio, negalėjo susipjaustyti kietesnės konsistencijos maisto produktų, užsirišti raištelių, sunkiai sekėsi rašyti. 10 metų amžiaus ENG ir EMG tyrimais nustatyti šėivinio nervo aksoninio tipo pažeidimo požymiai ir miotonijos požymiai raumenyse. Po 2 metų klinikinio neurologinio tyrimo konstatuota amimija, netaisyklinga laikysena ir sutrikusi pusiausvyra. Pacientas negalėjo paeiti ant kulnų, nepašokinėjo ant vienos kojos, laiptais galėjo lipti tik prisilaikydamas. Nustatyta pėdų hipestezija, sutrikęs vibracinis jutimas distalinėse rankų ir kojų dalyse. Kelių ir Achilo sausgyslių refleksų negauta. Stebėtos atskirų raumenų grupių hipotrofijos (distalinių galūnių dalių) ir hipertrofijos (nugaros raumenų). Raumenų jėga rankose 3–4 balai, kojose proksimaliai 4, o distaliai 2 balai iš 5. Tuo metu ENG tyrimu rankose vidurinio nervo jutiminio atsako NLG normalus, o alkūninio nervo sulėtėjęs (35 m/s), kojose blauzdos odos nervo pailgėjusi distalinė latencija (9,3 ms) esant sulėtėjusiam NLG (15 m/s). Tiriant rankose vidurinio ir alkūninio nervo motorinio atsako amplitudės sumažėjusios (4,6 ir 2,2 mV), distalinė latencija pailgėjusi (4,9 ms), taip pat ir kojose šėivinio nervo motorinio atsako amplitudė sumažėjusi (0,5 mV), distalinė latencija sulėtėjusi. NKS tyrimu nustatytas homozigotinis *HINT1* geno patogeninis variantas NM\_005340.6:c.110G>C (p.(Arg37Pro)).

24 metų amžiaus pacientė skundėsi rankų ir kojų raumenų silpnumu, pėdų tirpimu ir šalimu. Nuo 4 metų amžiaus tėvai pastebėjo, kad mergaitei sunku bėgti, greitai pavargsta, negali pašokinėti ant vienos kojos. 9 metų amžiaus buvo įtarta miopatija, tačiau raumens biopsijos tyrimu skersaruožių skeleto raumenų morfologinių pokyčių nenustatyta. Progresavo pėdų deformacija. 11 metų amžiaus klinikinio neurologinio tyrimo metu nustatytas sutrikęs vibracinis jutimas distalinėse rankų ir kojų dalyse. Giliųjų sausgyslių refleksų negauta rankose ir kojose. Nustatyta sumažėjusi jėga rankose ir ryškiau kojose. Tuo metu diagnozuota CMT. Atlikus CMT1A genetinės srities tyrimą, delecija ir (ar) duplikacija nenustatyta. 19 metų amžiaus atlikus ENG tyrimą, nustatytas aksoninio tipo motorinių ir sensorinių nervinių skaidulų pažeidimas. EMG tyrimas atliktas adatiniu elektrodu, tirti rankų ir kojų raumenys. Registruotas raumenų patologinis spontaninis aktyvumas (pavienės fibriliacijos, fascikuliacijos, negausūs pseudomiotoniniai iškrūviai), rodantys aktyvios denervacijos požymius. Vyravo reikšmingai padidėjusios amplitudės ir pailgėję motorinio vieneto veikimo potencialai, rodantys pasireiškiantį lėtinės reinervacijos procesą. Pacientės vyresnė sesuo nuo ankstyvos vaikystės patyrė panašius simptomus. Remiantis šiais duomenimis buvo įtartas AR paveldėjimas. Atlikus NKS tyrimą nustatyti du variantai *HINT1* gene: NM\_005340.6:c.110G>C

(p.(Arg37Pro)) ir NM\_005340.6:c.299A>G (p.(Glu100Gly)). Pastarasis *missense* variantas (c.299A>G) mokslo literatūroje neaprašytas ir anksčiau nebuvo pateiktas viešosiose variantų duomenų bazėse (dbSNP, 1000 genomų, egzomų variantų serveryje ir *ExAC*). Remiantis patogeniškumo įverčiais DANN, GERP, dbNSFP.FATHMM, LRT, MetaLR, MetaSVM, *MutationTaster*, SIFT variantas vertinamas kaip tikėtinas patogeninis. Retojo alelio dažnis 0,000004 yra mažesnis nei slenkstinis dažnis 0,0001 su AR paveldėjimo būdu siejamiems genams. Kituose genuose patogeninių variantų šiai pacientei nebuvo nustatyta.

### *GJB1*

59 metų amžiaus pacientė nuo paauglystės skundėsi progresuojančia nestabilia eiseną, bėgant kliūdavo kojos ir buvo sunku sportuoti mokykloje. Nuo 20 metų amžiaus pradėjo silpti rankos, išryškėjo pėdų deformacija. Nuo to laiko ji nebuvo stebima. Pacientė į gydytoją genetiką kreipėsi 55 metų amžiaus po išsamaus neurologinio tyrimo. Jo metu nustatyta sumažėjusi raumenų jėga: rankose ir kojose proksimaliai 3–4 balai iš 5, rankose distaliai 3 balai, o kojose distaliai 2 balai iš 5. Nustatyta hipestezija rankose iki dilbių distalinio trečdaliao ir kojose iki blauzdų distalinio trečdaliao, sutrikęs vibracinis ir skausmo jutimas distalinėse rankų ir kojų dalyse. Stebėta distalinių galūnių dalių raumenų atrofija. Gilieji sausgyslių refleksai simetriški, rankose labai žemi, kelių ir Achilo sausgyslių refleksų negauta. Apžiūrint stebėta pėdų deformacija, taip pat abi pėdos buvo nusvirusios. Pacientė negalėjo eiti ant pirštų bei kulnų. Kelerius metus ji vaikšto tik pasiremddama lazda. Laboratoriniai kraujo tyrimai, vitaminas B<sub>12</sub>, folio rūgštis ir imunologiniai tyrimai buvo normalūs. ENG tyrimu rankose vidurinio ir alkūninio nervų jutiminio atsako amplitudė sumažėjusi (3 mV), distalinė latencija pailgėjusi esant sulėtėjusiems laidumo greičiams, kojose šėvinio ir blauzdos odos atsakų negauta. Tiriant rankose vidurinio ir alkūninio nervo motorinio atsako amplitudė sumažėjusi (1,9–1,4 mV), distalinė latencija sulėtėjusi ir sulėtėję laidumo greičiai (37 m/s), taip pat ir kojose šėvinio ir blauzdos nervo motorinio atsako amplitudė sumažėjusi (0,3–0,4 mV), distalinė latencija sulėtėjusi (5,4–5,5 ms) ir sulėtėję laidumo greičiai (24–35 m/s). Šie rezultatai būdingi mišraus tipo motorinių ir sensorinių nervinių skaidulų pažeidimui. NKS tyrimu nustatytas heterozigotinis patogeninis *GJB1* geno variantas NM\_001097642.2:c.34G>A (p.(Gly12Ser)), kuris taip pat buvo identifikuotas kitoje šeimoje atlikus *GJB1* geno sekoskaitos tyrimą.

## *BSCL2*

14 metų amžiaus pacientė skundėsi pasikeitusia, šlepsinčia eiseną. Pirmieji simptomai pasireiškė 2,5–3 m. amžiaus, kai pradėjo skųstis vienos kojos skausmu. Skirti ortopediniai vidpadžiai. 13 metų amžiaus mergaitė pastebėjo, kad sumažėjo vienos blauzdos apimtis, pasikeitė eiseną. Po metų pastebėjo, kad ir kitos kojos apimtis sumažėjo, negali atsistoti ant pirštų galų, ant kulnų. Apžiūros metu abi pėdos nusvirusios, deformuotos (*pes cavus*), blauzdų raumenų atrofija. Laboratoriniai kraujo ir likvoro tyrimai atitiko normos reikšmes. Kreatinfosfokinazės aktyvumas buvo 115 U/L (norma 25–175 U/L). ENG tyrimu nustatyta mišraus tipo motorinė ir sensorinė polineuropatija. Abu pacientės tėvai sveiki. NKS tyrimu nustatytas patogeninis *BSCL2* geno heterozigotinis *missense* variantas NM\_001122955.3:c.455A>G, sukuriantis aminorūgšties pakeitimą iš asparagino į seriną (rs137852972; p.(Asn152Ser)). *BSCL2* geno patogeniniai variantai lemia įvairius klinikinius simptomus su persidengiančiais fenotipais, tokiais kaip distalinė paveldima motorinė neuropatija, CMT2 ir paveldima spastinė paraplegija (SPG17). Labiausiai tikėtina, kad egzistuoja modifikuojantys veiksniai, kurie paaiškina fenotipų kintamumą ir sumažėjusį pasireiškimą. Kituose rinkinio genuose patogeninių ar galimai patogeninių variantų pacientei nebuvo nustatyta, o patikslinti klinikinio fenotipo pacientė neatvyko.

Kitai pacientei, kuriai taip pat nustatytas *BSCL2* geno heterozigotinis *missense* variantas NM\_001122955.3:c.455A>G (p.(Asn152Ser)), ENG tyrimu nustatytas aksoninio tipo motorinių ir sensorinių nervinių skaidulų pažeidimas. NKS tyrimu patvirtintas CMT2 fenotipas.

## *GDAP1*

Šiam 28 metų amžiaus pacientui vaikystėje diagnozuota aksoninio tipo motorinė ir sensorinė neuropatija, o NKS tyrimu identifikuotas homozigotinis patogeninis variantas NM\_018972.2:c.844C>T (p.(Arg282Cys)) *GDAP1* gene. Sangerio sekoskaita patvirtinta, kad abu tėvai yra patogeninio varianto nešiotojai.

## *TRPV4*

Pacientei eisenos pokyčiai pasireiškė vaikystėje, o vėliau išsivystė gerklų raumenų silpnumas. Palaipsniui pasireiškė lėtai progresuojantis silpnumas, atrofija rankų bei kojų distaliniuose raumenyse kartu su jutimų sutrikimu. *TRPV4* gene nustatytas heterozigotinis patogeninis variantas NM\_021625.4:c.68G>A (p.(Ser23Asn)). Sangerio sekoskaitos metodu patvirtinta *de novo* varianto kilmė.

## Nauji patogeniniai / tikėtini patogeniniai variantai

### *ATAD3A*

25 metų amžiaus pacientas vaikščioti pradėjo nuo 14 mėnesių amžiaus, tačiau nestabiliai, remdavosi į sieną, nugriūdavo. Nuo gimimo diagnozuota plokščiapėdystė. Vaikui augant palaipsniui progresavo pėdų deformacija (*pes equinus*). Paauglystėje išsivystė skoliozė. Nuo 20 metų amžiaus nebegali bėgti. Jam sunku lipti laiptais žemyn, kliūna kojos už laiptų, o ilgiau pa-vaikščiojus pasireiškia blauzdų skausmas ir tirpimas. Pacientui dėl progresuojančios pėdų deformacijos 21 metų amžiaus atlikta abiejų pėdų ortopedinė operacija. Nepaisant jos, pacientas savarankiškai nueina tik trumpus atstumus, dažniausiai reikia asistento pagalbos. Rega ir klausia normali. Mokėsi pagal adaptuotą programą. Nustatytas intelekto koeficientas IQ = 75. Objektyvaus tyrimo metu konstatuota sutrikusi eisena, pusiausvyra, pacientas negalėjo stovėti pasistiebęs ir ant kulnų, atsitūpti ištiestomis pėdomis. Pasireiškė rankų tremoras. Užfiksuota pasireiškianti rankų ir kojų raumenų atrofija, labiausiai distalinėse dalyse. 19 metų amžiaus ENG tyrimo metu nustatytas žymus aksoninio tipo nervinių skaidulų pažeidimas. Tiriant kojose jutiminių nervų atsakų abipus negauta. Rankose tirtų motorinių nervų atsakai sumažėjusios amplitudės, pailgėjusios distalinės latencijos, NLG sulėtėję, o jutiminių nervų atsakai žymiai sumažėję. *ATAD3A* gene nustatytas naujas heterozigotinis variantas NM\_018188.3:c.556C>T (p.(Arg186Trp)), kuris, remiantis patogeniškumo įverčiais, yra patogeninis. Segregacijos analizė nebuvo atlikta.

### *AARS*

3 metų amžiaus mergaitė pradėjo šlubuoti kaire koja. Tėvai pastebėjo, kad keičiasi mergaitės eisena, pradėjo sukti kojas į vidų, užkliūti. ENG tyrimu nustatytas šeivinio nervo motorinio atsako pakitimas kairėje kojoje, būdingas demielinizuojančio tipo pažeidimui. NKS tyrimu nustatytas naujas heterozigotinis variantas *AARS* gene NM\_001605.2:c.1643T>C (p.(Leu548Pro)), kuris, remiantis fenotipu ir patogeniškumo įverčiais, paaiškina pacientės ligą.

### *DCTNI*

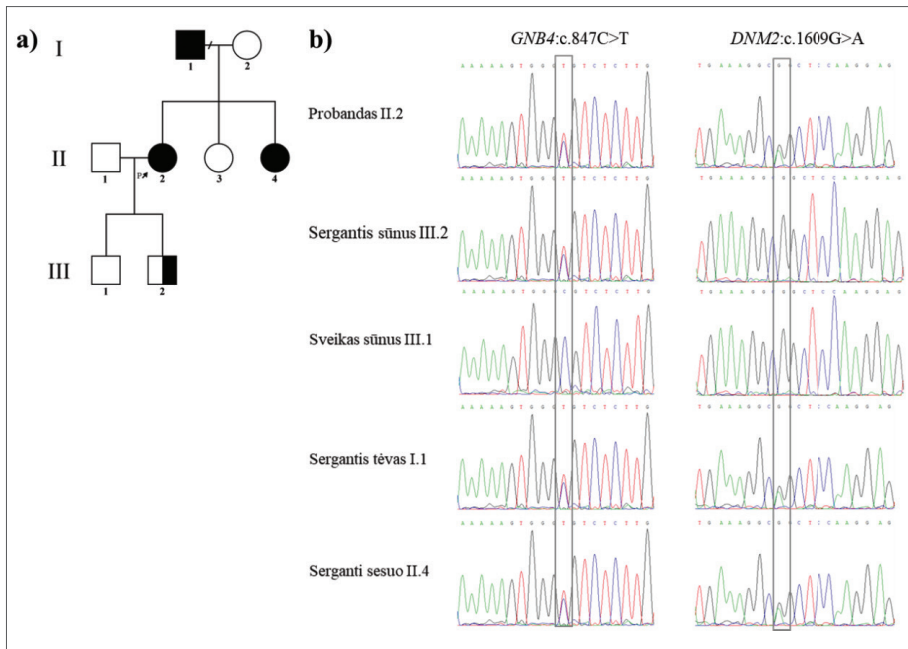
12 metų amžiaus pacientė skundėsi, kad sunku vaikščioti, po fizinio krūvio jaučia silpnumą kojose. Nuo 7 metų amžiaus pradėjus lankyti mokyklą tėvai pastebėjo, kad mergaitė eina tarsi nestabiliai, palinkusi į priekį, einant krypta kojos, sunkiai bėgioja. Objektyvaus tyrimo metu nustatyti sumažėję kelių ir Achilo sausgyslės refleksai. ENG tyrimu rankose motorinių ir sensorinių nervų pažeidimo nenustatyta. EMG tyrimu užfiksuoti neurogeninio tipo



motorinio vieneto veikimo potencialai. *DCTN1* gene nustatytas naujas heterozigotinis variantas NM\_004082:c.1295C>G (p.(Ala432Gly)). Segregacijos analizė parodė, kad variantą pacientė paveldėjo iš motinos, kuriai objektyvaus tyrimo metu taip pat nustatyti neuropatijai būdingi požymiai.

#### *GBN4* ir *DNM2*

25 metų amžiaus pacientei pirmieji simptomai – nukabo pėdos – pasireiškė nuo 16 metų amžiaus. Nuo 18 metų amžiaus sutriko smulkioji motorika, buvo sunku suimti smulkius daiktus. Vėliau pasireiškė riešų silpnumas, rankų tirpimas ir skausmas. Nuo 21 metų amžiaus eisenai stabilizuoti skirti ortopediniai abiejų kulkšnių įtvarai. Nuo 23 metų amžiaus pacientė nešioja ortopedinius įtvarus iki kelių. Klinikinio neurologinio tyrimo metu nustatyta hipestezija distalinėse kojų dalyse iki viršutinio blauzdų trečdaliao, sutrikę gilieji jutimai. Raumenų jėga rankose proksimaliai įvertinta 4, distaliai 4, o kojose proksimaliai 4 ir distaliai 0 balų iš 5. Taip pat nustatyta rankų ir kojų distalinių dalių išreikšta atrofija. ENG tyrimo rezultatai parodė išreikštą mišraus tipo sensorinę ir motorinę neuropatiją. Pacientės seseriai ir tėvui taip pat pasireiškė panašus fenotipas. Tėvui naujagimystės laikotarpiu buvo diagnozuota įgimta šleivapėdystė ir taikyta korekcija pagal Ponseti metodą, o vėliau vaikystėje atlikta abipusė achilotomija. 58 metų amžiaus nustatytas rankų tremoras, rankų jėga distaliai įvertinta 4 balais, o kojose proksimaliai 4, distaliai – 1–2 balais iš 5. Užfiksuota plaštakų ir pėdų pirštų deformacija, žymi atrofija plaštakose, blauzdose ir pėdose. Jis nurodė hipesteziją plaštakose ir blauzdose, distaliai pėdose beveik išnykęs skausmo jutimas. Sausgyslių refleksų atsakų negauta rankose ir kojose. Pacientės sesers eisenos pokyčiai pastebėti nuo 11 metų amžiaus, ji nelanko kūno kultūros pamokų mokykloje. Vienam iš pacientės sūnų taip pat vėlavo judesių raida, o vaikščioti pradėjo pasistiebę, rotuodamas pėdas į vidų. Tikslinio genų rinkinio tyrimas nustatė du heterozigotinius variantus: *DNM2* gene NM\_001005361:c.1609G>A (p.(Gly537Ser)) ir *GBN4* gene NM\_021629:c.847C>T (p.(Arg283Cys)). Segregacijos analizė tarp šeimos narių parodė, kad abu variantus pacientė ir jos sesuo paveldėjo iš tėvo, o sūnus tik vieną naują *GBN4* geno variantą NM\_021629:c.847C>T (p.(Arg283Cys)) (žr. 16 pav.).



**16 pav.** Genealogija (a) ir sekvenogramų fragmentai (b) šeimos, kurioje nustatytas digeninis paveldėjimas. Sangerio sekoskaita patvirtino digeninį paveldėjimą šeimoje.

### *MARS*

14 metų pacientas skundėsi, kad skauda blauzdas, rytais sunku pradėti vaikščioti, negali paeiti ant kulnų, atsitūpti ištiesta pėda, šąla galūnės, pasikeitė eiseną. Išvardyti simptomai pasireiškė prieš metus. Abu paciento tėvai sveiki. Sausgyslių refleksų atsakai rankose buvo normalūs, o kojose gauti žemi Achilo sausgyslės refleksų atsakai. Nustatyta *pes cavus*. ENG tyrimu nustatyti pokyčiai būdingi mišraus tipo sensorinei ir motorinei neuropatijai. Tikslinio genų rinkinio tyrimas nustatė naują heterozigotinį variantą *MARS* gene NM\_004990.3:c.1340G>A (p.(Ser447Asn)). *In silico* prognostinės programos klasifikuoja šį variantą kaip patogeninį ir galimai keičiantį baltymo funkciją.

### *LITAF*

64 m. amžiaus pacientė pirmuosius simptomus, kurie pasireiškė kojų pirštų tirpimu, pajuto prieš 10 metų. Vėliau pėdų tirpimas išplito į blauzdas iki kelių, pasireiškė duriančio pobūdžio skausmas. Laboratoriniai ir instrumentiniai tyrimai aiškios simptomų priežasties neparodė. Neurologinio tyrimo metu nustatyta hiperestezija kojose distaliai iki kelių, kojose negauta sausgyslių refleksų atsakų, stebėtas rankų tremoras. ENG tyrimu nustatyti senso-

rinių ir motorinių nervų pokyčiai, vyraujant sensorinių nervų pažeidimui. Naudojant tikslinį genų rinkinį NKS nustatytas naujas *LITAF* geno variantas NM\_001136472.1:c.418G>A (p.(Ala140Thr)).

### 3.2.7.1. Tikslinio genų rinkinio taikymo reikšmė *Charcot–Marie–Tooth* liga sergančių pacientų molekuliniėje diagnostikoje

Šiame tyrime nustatėme diagnostinę NKS vertę CMT sergančių pacientų grupėje. Visiems, į tyrimą įtrauktiems pacientams, CMT1A geninės srities duplikacija nebuvo nustatyta. Sangerio sekoskaitos metodas buvo lėtas ir daug sąnaudų reikalaujantis tyrimo metodas, ypač pacientams, kurių fenotipai mažai skyrėsi. O tikslinio genų rinkinio tyrimas NKS metodu leido vienu metu iširti 150 su CMT ir susijusiomis neuropatijomis siejamų genų. Tai greitas ir našiausias, ekonominiu ir laiko atžvilgiu efektyviausias sprendimas, leidžiantis vienu metu tirti įvairių genų kiekį. Šiuo metu paveldimų neuropatijų molekulinei diagnozei nustatyti naudojami įvairių genų skaičių apimantys rinkiniai. Skirtingų genų rinkinių diagnostinius rezultatus sunku palyginti, nes nustatoma daug tikėtinų patogeninių ar nežinomos klinikinės reikšmės variantų. Tačiau, net ir naudojant skirtingus genų rinkinius, aiški molekulinė diagnozė nustatoma mažiau nei pusei pacientų. Tokiu atveju tikėtina, kad genai, kurių patogeniniai variantai lėmė šių pacientų fenotipus, nebuvo įtraukti į tiriamų genų rinkinį. Taip pat gali būti, kad kai kuriems pacientams ligą gali sukelti daugiau nei viename gene esantys patogeniniai variantai, lemiantys naujus fenotipus, todėl rezultatų interpretavimas yra sunkus ir tiksli molekulinė diagnozė gali būti nenustatyta. Šiame tyrime vienai pacientei nustatytas *HINT1* geno vienas patogeninis variantas derinyje su neaiškios klinikinės reikšmės variantu, todėl toks genotipas suderinamas su nustatytu fenotipu. Pacientams, kuriems aiškus AR paveldėjimas, o nustatytas tik vienas patogeninis variantas, įmanoma, kad kitas variantas buvo kai kuriose mažo padengimo vietose arba galėjo būti giliai introne esantys variantai ar kopijų skaičiaus pokyčiai, kurie nebuvo analizuojami tiriant šį genų rinkinį. Pasirinktas genų rinkinys yra tinkamas pacientų, kuriems nustatyta paveldima neuropatija, diagnostikai, nes apima visus šiuo metu žinomus su paveldimomis neuropatijomis siejamus genus, o pacientai, kuriems nenustatyta dažniausia molekulinė diagnozė, pirmiausia turi būti tiriami naudojant tuo metu su neuropatijomis siejamų žinomų genų rinkinį. Kitas šio genų rinkinio privalumas yra tas, kad jį bet kada galima atnaujinti, kai identifikuojami nauji ligos genai. Tačiau, atsižvelgiant į naujų PN genų identifikavimo spartą, tokį genų rinkinį reikėtų gana

dažnai atnaujinti. Nepaisant to, kai kuriems pacientams molekulinė diagnozė vis tiek liktų nenustatyta, kadangi PN būdingas fenotipų heterogeniškumas ir fenotipai dažnai persidengia arba polineuropatija yra kitos ligos vyraujantis požymis, todėl klinikinė diagnozė gali būti nustatyta neteisingai. Tokiu atveju su ligos molekuline priežastimi susijusio geno paprasčiausia nebūtų rinkinyje. Taigi, tikslinio genų rinkinio NKS gali nustatyti molekulinę diagnozę arba ne. Viso egzomo sekoskaita tokiu atveju yra antro pasirinkimo tyrimas, kuriuo tikimasi, kad molekulinę diagnozę pavyks nustatyti.

Šiame tyrime nustatėme tikslinio genų rinkinio NKS kaip diagnostinės priemonės veiksmingumą 44,12 proc. (15/34) pacientų. Taigi, molekulinę CMT diagnozę patvirtinančius patogeninius variantus identifikavome rečiau paplitusiuose su CMT siejamuose genuose, išskyrus vieną pacientę, kuriai Sangerio sekoskaitos metodu nebuvo nustatytas *GJB1* geno variantas NM\_001097642.2:c.34G>A (p.(Gly12Ser)). Trims pacientams, kuriems pasireiškė neuromiotonija ir aksoninė neuropatija, nustatyti patogeniniai variantai *HINT1* gene. NKS tyrimu 17,65 proc. (6/34) pacientų buvo nustatyti nauji, anksčiau mokslo literatūroje neaprašyti, variantai. Šis dažnis beveik atitiko tikėtiną molekulinės diagnozės dažnį, nes pacientų fenotipai buvo aiškiai apibrėžti, o, remiantis naujausia literatūra, galima teigti, kad NKS tyrimu vidutiniškai pusei tiriamųjų identifikuojama molekulinė priežastis. Pavyzdžiui, M. F. Dohrnas ir bendraautoriai, naudodami tikslinio 84 genų rinkinio NKS ištyrė 612 CMT segančių pacientų ir genetinę sutrikimų priežastį identifikavo 20 proc. tiriamųjų (Dohrn et al., 2017). Kitame naujame tyrime S. Vaeth ir bendraautorių tikslinio genų rinkinio NKS diagnostinė vertė sudaro 21 proc. (Vaeth et al., 2017). Tačiau abiejuose tyrimuose buvo analizuoti skirtinguose centruose besilankančių pacientų DNR mėginiai. Mūsų tyrime visiems pacientams genetinės konsultacijos suteiktos viename centre, taip pat viename centre daugeliui pacientų atliktas klinikinis neurologinis ir ENG tyrimas. Heterogeninių pacientų grupių tyrimai rodo, kad tikslinio genų rinkinio NKS yra naudinga diagnostinė priemonė, tačiau išlieka didesnė teigiamų rezultatų tikimybė, kai pacientus konsultuoja tie patys vieno centro specialistai. Šis tyrimas taip pat pabrėžia fenotipų nustatymo svarbą prieš pasirenkant NKS tyrimus. Pirmiausia pacientui turi būti atlikti išsamūs klinikiniai ir kiti laboratoriniai bei instrumentiniai tyrimai tam, kad klinikinis fenotipas būtų kaip įmanoma tiksliau nustatytas. Keliems pacientams fenotipas nebuvo išsamiai įvertintas, todėl tai komplikavo NKS rezultatų interpretaciją, nes identifiukuoti variantai kiekvienu atveju buvo susiję su keliais fenotipais. Neaiškios klinikinės reikšmės variantai nustatyti 17,65 proc. (6/34) pacientų, tačiau reikia

daugiau įrodymų, kurie pagrįstų jų patogeniškumą. Vienai pacientei nustatyti du patogeniniai variantai genuose, kurie abu siejami su CMT-T. Pacientų, kuriems nustatyti anksčiau mokslo literatūroje aprašyti patogeniniai variantai, fenotipai buvo aiškiai suderinami su genotipais.

### 3.2.8. Viso egzomo sekoskaitos rezultatai

Bendradarbiaujant su dr. Tobiasu Haacku iš Vokietijos ir prof. Kenjiro Kosaki iš Japonijos, VES tyrimas atliktas trimis vaikams, kuriems nustatytas nespecifinis neuropatijos fenotipas, ir trimis suaugusiesiems, kuriems nustatytas CMT2 fenotipas, o NKS tyrimu, naudojant tikslinį genų rinkinį, patogeninių variantų, paaiškinančių PN priežastį, nenustatyta. Šiems trimis pacientams viso egzomo sekoskaitos tyrimu patogeninių, galimai patogeninių ir neaiškios klinikinės reikšmės variantų, susijusių su aiškiu CMT2 fenotipu, nenustatyta. Tačiau visiems trimis vaikams nustatyti pakitę aleliai, atitinkantys molekulinės diagnozės kriterijus. Vienai pacientei nustatyta AR būdu paveldima liga, o dviem – AD. Vienai pacientei nustatyta *de novo* vieno nukleotido delecija *MPZ* gene NM\_000530.7:c.558delG (p.(Arg186Serfs)), kuri aprašyta anksčiau šiame darbe *MPZ* dalyje (žr. 3.2.3.).

Antra pacientė konsultuota 5 m. amžiaus. Mergaitės judesių raida vėlavo, vaikščioti pradėjo 17 mėn. amžiaus. Pradėjus vaikščioti, eiseną buvo krypuojanti, mergaitė negalėjo atsitūpti. Klinikinio neurologinio tyrimo metu nustatyta kojų distalinių dalių hipotrofija. Laboratoriniai kraujo ir nugaros smegenų skysčio tyrimai atitiko normos reikšmes. Kreatinfosfokinazės aktyvumas buvo 175 U/L (norma 25–175 U/L). ENG tyrimas neatliktas dėl jauno pacientės amžiaus ir padidėjusio jautrumo. Pirmiausia, atlikus VES tyrimą, siekiant nustatyti homozigotinius ar sudėtinius heterozigotinius retus DNR sekos variantus, buvo identifikuoti 7 genai. Du iš jų (*ZNF469* ir *LOXHD1*) yra siejami su AR būdu paveldimomis ligomis ir yra įtraukti į OMIM duomenų bazę. Tačiau antras pakitęs alelis šiuose genuose nebuvo nustatytas, o nustatyti variantai nepaaiškino fenotipo. Tolesnės variantų paieškos rezultatas – nustatytas retas *DYNC1H1* geno heterozigotinis *missense* variantas NM\_001376.4:c.1792C>T (p.(Arg598Cys)). *ClinVar* duomenų bazėje varianto identifikacinis numeris 143271. Variantas yra žinomas kaip patogeninis ir siejamas su keliais fenotipais: 1 tipo spinaline raumenų atrofija ir CMT. Sangerio sekoskaitos metodu patvirtinta *de novo* varianto kilmė. Papildomi tyrimai pacientei nebuvo atlikti dėl jauno amžiaus.

Trečiai pacientei nuo ankstyvos kūdikystės vėlavo judesių raida, progresavo hipotonija, bulbarinis paralyžius ir vėliau – apatinio motorinio neurono pažeidimo požymiai. VES tyrimu pirminė gautų variantų paieška atlikta pagal paieškos kriterijus „neuropatija“, „neuronopatija“. *SLC52A2* gene nustatytas sudėtinis heterozigotinis fenotipas. Pacientė retą patogeninį *missense* variantą NM\_001253815.1:c.1016T>C (p.(Leu339Pro)) paveldėjo iš savo tėvo. Kitą naują *missense* variantą NM\_024531.4:c.377G>A (p.(Cys126Tyr)) paveldėjo iš motinos. Iš tėvo paveldėtas variantas (c.1016T>C) nustatytas daugeliui pacientų. *In vitro* tyrimais įrodyta, kad toks pakitęs baltymas neprisijungia <sup>3</sup>H-riboflavino (Foley et al., 2014). Iš motinos paveldėtas naujas retas (alternatyvaus alelio dažnis < 0,01) *missense* variantas anksčiau nebuvo susietas su riboflavino nešiklio stoka. Variantas vertinamas kaip galimai patogeninis remiantis DANN (0,99), GERP (3,65), LRT (0,84), *MutationAssessor* (0,928), *MutationTaster* (1), SIFT (0), *PolyPhen2* (0,99) ir PROVEAN (-10,88) įverčiais. Filogenetiniu požiūriu naujas variantas yra vidutiniškai konservatyvioje baltymo skaitymo rėmelio vietoje, todėl prarandama baltymo funkcija ir tai yra galimas patogenetinis mechanizmas, kuris atitinka ankstesnius pastebėjimus. Apibendrinami šiuos rezultatus teigiame, kad nustatyti abu variantai lemia funkcijos praradimą gene, kuris netoleruoja funkcijos praradimo variantų ir lemia 2 tipo riboflavino stoką, paveldimą AR būdu. Pacientės fenotipas papildoma šiuos duomenis, nes, pradėjus gydyti didelėmis riboflavino dozėmis, konstatuotas minimalus terapinis efektas.

### 3.2.8.1. Viso egzomo sekoskaitos reikšmė neuroraumeninių ligų diagnostikoje

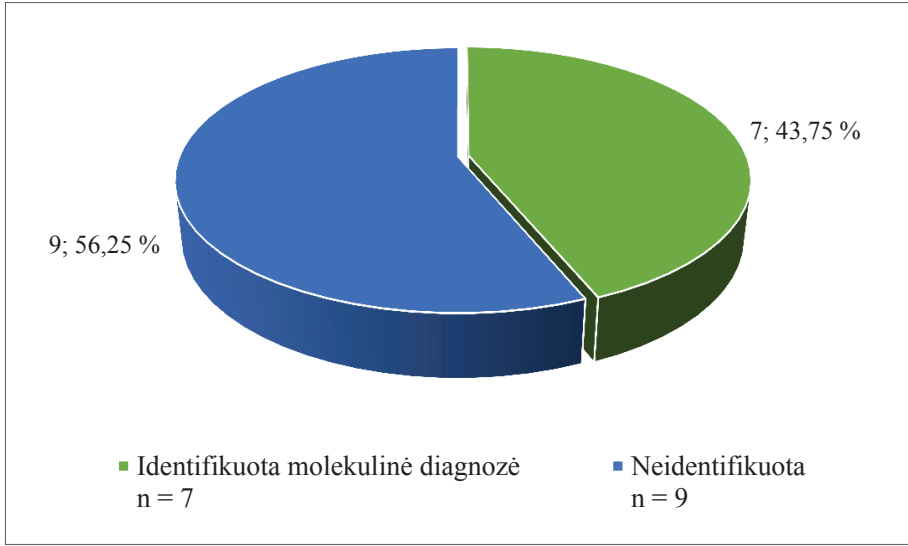
VES tyrimas atliktas keliems pacientams, kuriems pasireiškė neuroraumeninės ligos fenotipas. Tyrimo rezultatai papildoma šiuolaikinę sampratą, kad VES yra efektyvus diagnostikos įrankis. Jei molekulinė diagnozė ir lieka nenustatyta, praėjus tam tikram laikotarpiui rezultatus galima peržiūrėti dar kartą susiejant juos su naujausia mokslo informacija. Šiuo tyrimu, kaip ir genų rinkinių NKS tyrimais, galima identifikuoti naujus patogeninius variantus su ligomis siejamuose genuose, tačiau VES pranašus tuo, kad leidžia identifikuoti naujus genus. Šiame tyrime nauji genai nebuvo identifikuoti, bet tai galima paaiškinti per mažu tiriamųjų skaičiumi. Trims pacientams, kuriems nustatytas CMT2 fenotipas, naujų genų nebuvo identifikuota. Vieno paciento genealogija buvo aiškiai AD, o kitų – tikėtina AR. Pirmojo paciento atveju būtų informatyvu atlikti VES dar bent vienam sergančiam asmeniui ir tai tikimasi įvykdyti ateityje. Kitų dviejų pacientų atvejais, kai VES tyrimu molekulinė diagnozė liko nenustatyta,

reikėtų ateityje atlikti kitus tyrimus, tikintis, kad išaiškinti priežastį vis dėlto pavyks. Dalijantis duomenimis, VES rezultatai yra svarbūs būsiamiems tyrimams dėl alternatyvių alelių dažnių nustatymo, kurie naudojami duomenims filtruoti ir kandidatiniams variantams identifikuoti. VES privalumas, kai tyrimas naudojamas kaip diagnostikos metodas, yra reikšmingas ir turi būti apsvarstytas sprendžiant dėl bet kurio konkretaus paciento genetinių tyrimų schemos. Genų rinkiniai, VES ir VGS skiriasi savo privalumais ir trūkumais. Metodams, kurių pagrindas yra tam tikrų fragmentų papildymas ir pagausinimas, būdingas nevisiškas padengimas. Pavyzdžiui, VGS horizontalus sekos padengimas geresnis nei VES. Tačiau genų rinkiniai ir VES pasižymi didesniu jautrumu, kuris naudingas siekiant nustatyti žemą mozaikiškumą (Hegde et al., 2017; Santani et al., 2017). Priklausomai nuo klinikinio ar mokslinio klausimo, reikėtų pasirinkti tinkamiausią metodą ir tyrimų planą.

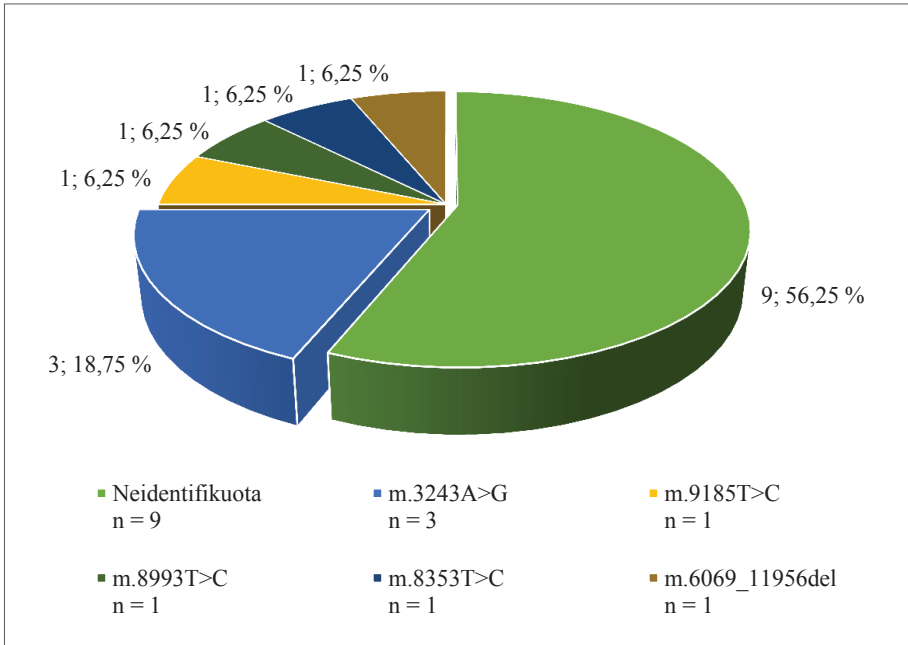
### 3.2.9. Apibendrinimas

Paveldimos neuropatijos yra sudėtingi sutrikimai, pasireiškiantys įvairiais fenotipais. Daugeliui jų būdingas heterogeniškumas ir atskiri sutrikimai yra labai reti. Šios savybės labai sunkina tikslios molekulinės diagnozės nustatymą. Šiame darbe aprašyti nauji ir anksčiau identifikuoti patogeniniai variantai susiję su pacientų, kuriems pasireiškė PN, fenotipais. Darbe tyrėme du genomus siekdami identifikuoti molekulinę diagnozę pacientams pasitelkę tradicinę Sangerio sekoskaitą ir naujos kartos sekoskaitos technologija pagrįstus metodus. Molekulinė diagnozė nustatyta daugiau nei 30 giminytės ryšiais nesusijusių pacientų. Patogeniniai mtDNR variantai nustatyti 43,75 proc. pacientų (žr. 17 pav.). Mitochondrinės DNR patogeninis variantas NC\_012920.1:m.3243A>G (p.Ala3243Gly) buvo dažniausias pacientų, kuriems nustatyta mitochondrinė liga, grupėje (18,75 proc.) (žr. 18 pav.) ir pasireiškė fenotipų heterogeniškumu. Anksčiau rutiniškai mtDNR sekoskaitos tyrimai nebuvo taikomi. Šio tyrimo rezultatai patvirtino hipotezę, kad, įtariant klasikinį mitochondrinį sindromą, pirmiausia reikia tirti dažniausius mtDNR patogeninius variantus, o, jų nenustačius, atlikti viso ilgio mtDNR sekoskaitą.

Šis tyrimas, kaip ir daugelyje šalių atlikti tyrimai, parodė, kad dažniausias CMT potipis yra CMT1A, kurį lemia *PMP22* duplikacija (31,14 proc.; 38/122). Analizuotų CMT1A pacientų grupėje atipinė simptomų pradžia rnkose nustatyta vienam pacientui. Buvo nustatyti reikšmingi skirtumai tarp lyčių: moterims pasireiškė jutimų sutrikimai, negauti sausgyslių refleksų atsakai ir reabilitacinis gydymas. Įvertinus vidutinį amžių, kai moterims dia-



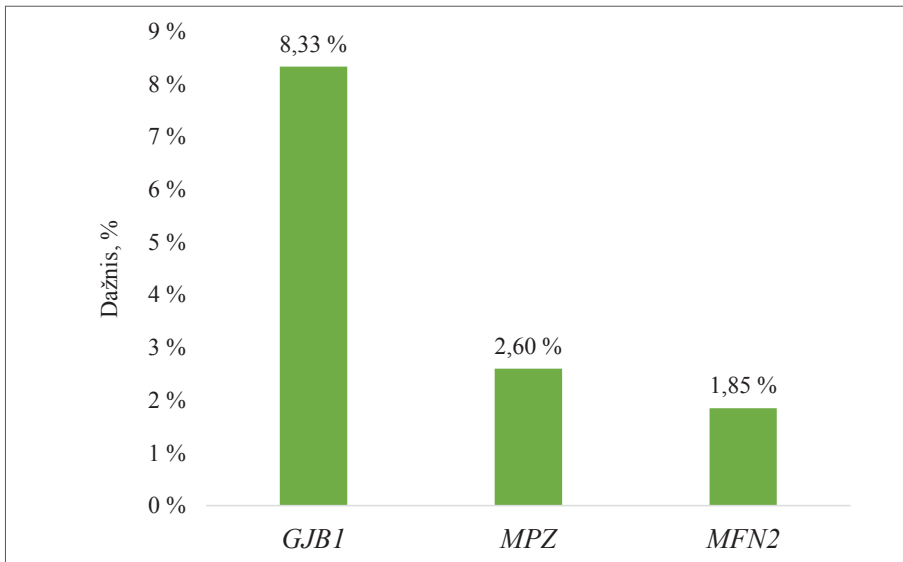
**17 pav.** Patogeninių mtDNR variantų dažnis mitochondrinių sindromų pacientų grupėje



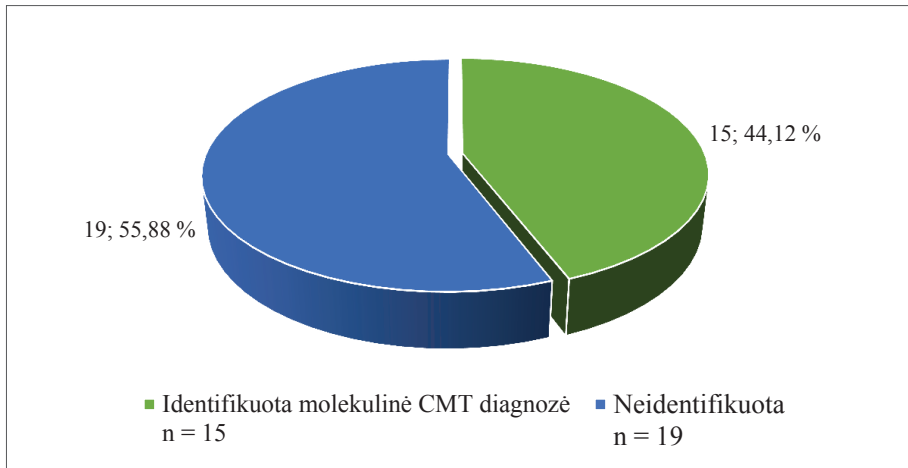
**18 pav.** mtDNR patogeninių variantų dažnis ir įvairovė pacientų grupėje, kuriems nustatytas klasikinis mitochondrinis sindromas



gnozuota CMT1A, reikšmingų skirtumų tarp lyčių nebuvo nustatyta. Natūralios CMT1A ligos eigos rezultatai yra svarbūs kaupiant informaciją apie natūralią ligos eigą tarp sergančiųjų skirtingose šalyse, nes ji gali būti reikšminga ateityje kuriant naujus gydymo būdus. Antra dažniausia CMT molekulinė priežastis buvo susijusi su *GJB1* geno patogeniniais variantais ir sudarė 8,33 proc. (7/84). Iš viso penki patogeniniai variantai nustatyti 7 pacientams. Dviem pacientams nustatytas naujas *GJB1* geno patogeninis variantas NM\_001097642.2:c.290A>G (p.(His97Arg)), o vienai pacientei – NM\_000166:c.476delG (p.(Gly159Alafs)). Šis rezultatas išplėtė *GJB1* geno patogeninių variantų įvairovę, tačiau atipinių fenotipų sergantiesiems nebuvo nustatyta. Naujas patogeninis NM\_001097642.2:c.290A>G (p.(His97Arg)) variantas galėtų būti geografiškai reikšmingas, tačiau reikia daugiau įrodymų. *MPZ* gene nustatyti du nauji patogeniniai variantai, kurie, tikėtina, lėmė įgimtą hipomielinizuojančią neuropatiją, tačiau nepakanka įrodymų, nes *n.suralis* biopsijos histologiniai tyrimai abiem pacientėms nebuvo atlikti. *MFN2* geno patogeniniai variantai labai retai paplitę mūsų sergančiųjų populiacijoje. Tik vienas patogeninis *MFN2* variantas NM\_014874.3:c.281G>A (p.(Arg94Gln)) buvo identifikuotas šiame tyrime (žr. 19 pav.). Pacientės fenotipas skiriasi nuo kitų literatūroje aprašytų fenotipų, nes daugeliui pacientų šis variantas lemia sunkią neuropatijos eigą. Manome, kad yra modifikuojantys veiksniai, tačiau reikia papildomų tyrimų, įrodančių fenotipą keičiančių veiksnių egzistavimą.



**19 pav.** Patogeninių variantų dažnis dažniausiai su CMT siejamuose genuose



**20 pav.** Tikslinio CMT genų rinkinio diagnostiniai rezultatai CMT pacientų grupėje

Naudojant tikslinį 150 genų rinkinį NKS molekulinė diagnozė nustatyta 44,12 proc. pacientų, iš jų – 41,17 proc. nustatyti patogeniniai variantai rečiau su CMT siejamuose genuose (išimčių sudaro viena pacientė, kuriai nustatytas *GJB1* geno patogeninis variantas) (žr. 20 pav.). Manome, kad svarbu pabrėžti, jog *HINT1* gene, kuris siejamas su neuromiotonija, patogeninis variantas NM\_005340.6:c.110G>C (p.(Arg37Pro)) nustatytas trimis pacientams. Dviem iš jų nustatytas homozigotinis genotipas, o vienai pacientei – sudėtinis heterozigotinis genotipas kartu su nauju variantu NM\_005340.6:c.299A>G (p.(Glu100Gly)). T. Milovidova ir bendraautoriai, ištyrę 700 CMT sergančių pacientų Rusijoje, 30 pacientų nustatė homozigotinį *HINT1* geno variantą NM\_005340.6:c.110G>C (p.(Arg37Pro))\* . Čekijoje *HINT1* geno variantai taip pat yra dažniausia neuromiotonijos ir aksoninės neuropatijos priežastis (Lassuthova et al., 2015), tačiau Ispanijoje ir Jungtinėje Karalystėje jie reti (Horga et al., 2015). Remiantis šiais rezultatais racionalu pacientams, kuriems pasireiškia neuromiotonija ir aksoninė neuropatija, pirmiausia rinktis *HINT1* geno NM\_005340.6:c.110G>C (p.(Arg37Pro)) varianto tyrimą. Vienai pacientei identifikuotas digeninis paveldėjimo būdas, lėmęs sunkiau pasireiškiantį CMT-T fenotipą. Nustatytų dviejų patogeninių variantų digeninis poveikis skirtinguose genuose gali moduluoti fenotipą, nes abiejų genų produktai yra susiję su endosomų rūšiavimu ir ląstelių signaliniais keliais, galimai sąveikaujančiais panašiais būdais. Šis tyrimas ir anksčiau aprašyti CMT atve-

\* <http://www.abstractsonline.com/pp8/#!/4652/presentation/2285>

jai, kuriuos lėmė susiję genų variantai, yra įspėjimas ieškoti kelių priežastinių genetinių veiksnių šeimose, kuriose pasireiškia fenotipinis kintamumas arba neįprasta raiška.

VES tyrimo rezultatai trims vaikams, kuriems pasireiškė neurologinis, įskaitant neuropatiją, fenotipas, patvirtino molekulinę diagnozę. Pacientei, kuriai nustatyta 2 tipo riboflavino nešiklio stoka, greitai gauti tyrimo rezultatai leido nedelsiant pradėti specifinį gydymą. Šis atvejis pabrėžia VES klinikinę naudą, kai molekulinė diagnozė nustatoma greitai ir pacientas pradėdamas tinkamai gydyti, išvengiant alternatyvių gydymo būdų, kurie ne tik nepadėtų, bet galėtų būti netgi žalingi interkurentinių ligų atveju.

Nauji technologiniai sprendimai pakeitė paveldimų ligų diagnostikos galimybes medicininėje genetikoje. Per pastaruosius metus NKS technologija pagrįsti metodai pasirodė esą tikslūs ir veiksmingi identifikuojant patogeninius DNR sekos variantus. Jie taip pat yra pigesni sąnaudų ir greitesni laiko atžvilgiu, taip pat reikalaujantys mažiau žmogiškųjų išteklių nei įprasta Sangerio sekosaita. Taikant šiuos metodus, laikas iki molekulinės diagnozės patvirtinimo žymiai sutrumpėjo didelei daliai pacientų. Tikslinio genų rinkinio NKS tyrimu gauti rezultatai išplėtė patogeninių variantų sąrašą CMT sergančių pacientų grupėje. Visgi dilema lieka, kai nustatomi prieštarinčiai vertinami DNR sekos variantai, taip pat tuomet, kai įtariamos paveldimos ligos etiologija nenustatoma, todėl tolesni tyrimai turi būti svarstomi individualiai tokiems pacientams. Pirmiausia, siektina išsiaiškinti neaiškios klinikinės reikšmės varianto poveikį baltymui ar nustatyti naujus galimai priežastinių genų variantus, kurių specifinis biologinis vaidmuo dar nėra visiškai išaiškintas.

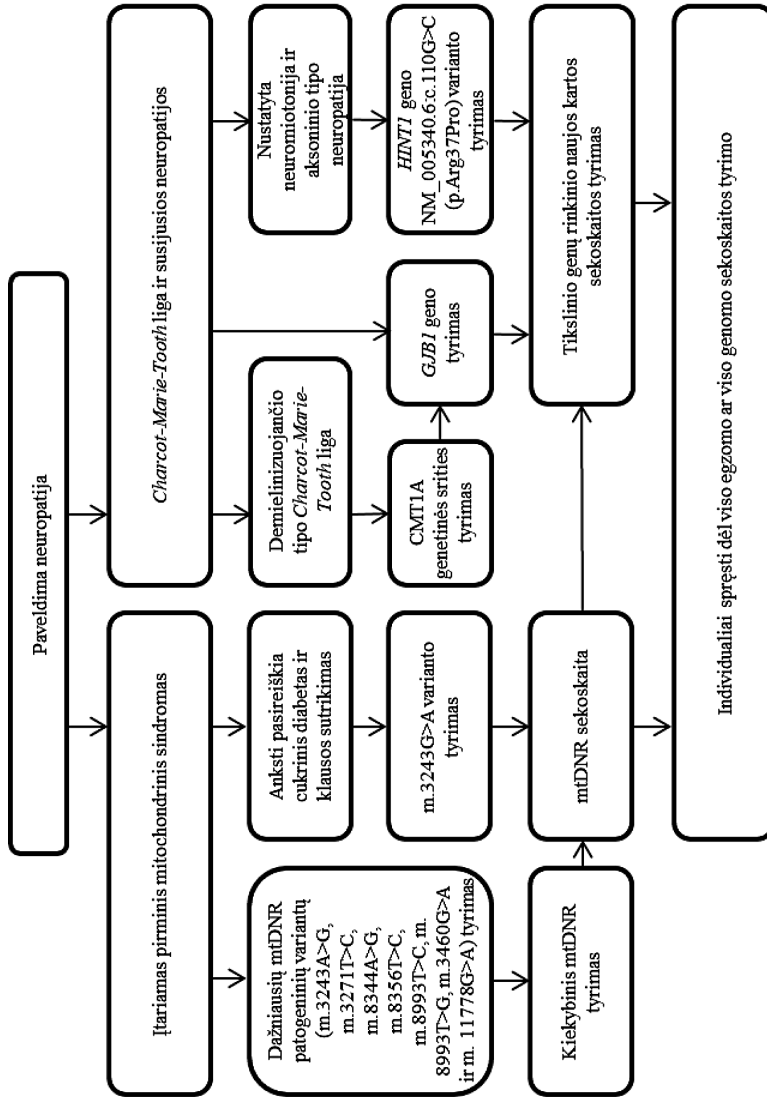
Šiuo metu nėra žinoma veiksmingo su paveldimomis neuropatijomis susijusių ligų gydymo. CMT neuropatijų atveju palaikomoji priežiūra apima kineziterapiją, užimtumo terapiją ir ortopedinį gydymą, skirtą pėdų deformacijai koreguoti ir eisenai stabilizuoti. Vaistų skiriama neuropatiniam ir mechaniniam skausmui malšinti. Be to, distalinių apatinių galūnių funkcijai palaikyti galimas chirurginis gydymas. Ateities perspektyvos yra potencialūs molekuliniai ir genetiniai terapiniai taikiniai. Kelios genų inžinerija pagrįstos technologijos suteikia unikalią galimybę sukurti veiksmingą paveldimųjų neurodegeneracinių sutrikimų gydymą, įskaitant beprasmius oligonukleotidus, morfolinus, deoksiribozimus ir RNR interferenciją (Watts, Corey, 2012). Šių technologijų požymis – slopinti pakitusio geno raišką. Daugiausia dėmesio šiandien sulaukianti mokslinių tyrimų technologija naudoja daugiagaliąsias kamienines ląsteles, kurios leidžia sumodeliuoti ligą *in vitro*, išsamiai analizuoti ligos patogenezę ir kurti modernius vaistus (Spitalieri et al., 2016).

## 4. IŠVADOS

1. 1A tipo *Charcot–Marie–Tooth* liga yra dažniausiai nustatomas potipis *Charcot–Marie–Tooth* liga sergančių pacientų grupėje. Šiame tyrime jis nustatytas dviem trečdaliams CMT1 sergančių pacientų grupėje ir sudarė vieną trečdalį visoje *Charcot–Marie–Tooth* liga sergančiųjų grupėje. Pacientams, kuriems diagnozuotas CMT1A potipis, statistiškai reikšmingų skirtumų tarp lyčių nenustatyta ( $p = 0,592$ ).
2. *GJB1* geno patogeniniai variantai yra antra pagal dažnį molekulinė *Charcot–Marie–Tooth* ligos priežastis, o *MPZ* ir *MFN2* genų patogeniniai variantai žymiai retesni sergančių *Charcot–Marie–Tooth* liga pacientų grupėje.
3. *MT-ATP6/8* genų patogeniniai variantai sergančių *Charcot–Marie–Tooth* liga pacientų grupėje šiame tyrime neidentifikuoti.
4. Mažiau nei pusei pacientų (43,75 proc.) kuriems įtartas klasikinis mitochondrinis sindromas, nustatyti patogeniniai variantai mitochondrinėje DNR. Pasireiškianti neuropatija – aksoninio tipo, kurios pasireiškimas, remiantis elektrofiziologiniais įverčiais, kito nuo normos iki lengvos neuropatijos.
5. Naujos kartos sekoskaitos tyrimas, taikomas tiksliniam genų rinkiniui, yra vertingas diagnostinis metodas ir efektyvi priemonė racionaliai *Charcot–Marie–Tooth* liga sergančių pacientų molekulinei diagnozei, tačiau žymus genotipo ir fenotipo heterogeniškumas išlieka diagnostinis iššūkis. Digeninis paveldėjimas gali būti nenustatytas, jei atliekami tik atskirų genų tyrimai.

## 5. METODINĖS REKOMENDACIJOS

- 5.1. Pirminiai mitochondriniai sindromai
  - 5.1.1. Pacientams, kuriems įtariamas pirminis mitochondrinis sindromas, rekomenduojama kelių etapų molekulinė diagnostinė strategija. Pirmame tyrimo etape rekomenduojama atlikti dažniausių mtDNR patogeninių variantų rinkinio tyrimą (m.3243A>G, m.3271T>C, m.8344A>G, m.8356T>C, m.8993T>C, m.8993T>G, m.3460G>A ir m.11778G>A). Antrame etape reikėtų atlikti kokybinį mtDNR tyrimą. Nenustačius molekulinės diagnozės, trečiame etape rekomenduojama atlikti viso ilgio mtDNR sekoskaitą. Nenustačius molekulinės diagnozės, dėl naujos kartos sekoskaitos technologija pagrįstų tyrimų spręsti individualiai.
  - 5.1.2. Pacientams, kuriems anksti pasireiškia cukrinis diabetas ir klausos sutrikimas, rekomenduojama gydytojo genetiko konsultacija ir m.3243G>A varianto tyrimas.
- 5.2. *Charcot–Marie–Tooth* liga ir susijusios neuropatijos
  - 5.2.1. Molekulinė diagnozė pagrįsta pacientų skirstymu pagal ENG tyrimo rezultatus į CMT1, CMT2 ir kitus fenotipus.
  - 5.2.2. Pacientams, kuriems nustatyta demielinizuojančio tipo *Charcot–Marie–Tooth* liga, rekomenduojama pirmiausia atlikti CMT1A genetinės srities tyrimą.
  - 5.2.3. Visiems *Charcot–Marie–Tooth* liga sergantiems pacientams, išskyrus tuos, kurių genealogijose per tėvo liniją liga perduodama sūnums, rekomenduojama atlikti *GJB1* geno tyrimą. Nenustačius molekulinės diagnozės, rekomenduojama atlikti tikslinio CMT ir susijusių neuropatijų genų rinkinio naujos kartos sekoskaitos tyrimą. Pacientams, kuriems naujos kartos sekoskaitos tyrimu, naudojant tikslinį genų rinkinį, molekulinė diagnozė lieka nenustatyta, rekomenduojama individualiai spręsti dėl VES tyrimo tikslingumo.
  - 5.2.4. Pacientams, kuriems nustatyta neuromiotonija ir CMT2, rekomenduojama pirmiausia atlikti *HINT1* geno NM\_005340.6:c.110G>C (p.(Arg37Pro)) varianto tyrimą. Nenustačius molekulinės diagnozės, šiems pacientams rekomenduojama atlikti tikslinio CMT ir susijusių neuropatijų genų rinkinio naujos kartos sekoskaitos tyrimą (žr. 21 pav.).



21 pav. Rekomenduojama pacientų, sergančių PN, genetinių tyrimų strategija

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Ando, M., Hashiguchi, A., Okamoto, Y., Yoshimura, A., Hiramatsu, Y., Yuan, J., . . . Takashima, H. (2017). Clinical and genetic diversities of Charcot-Marie-Tooth disease with MFN2 mutations in a large case study. *J Peripher Nerv Syst*, 22(3), 191-199. doi:10.1111/jns.12228
- Andrews, R. M., Kubacka, I., Chinnery, P. F., Lightowlers, R. N., Turnbull, D. M., & Howell, N. (1999). Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet*, 23(2), 147. doi:10.1038/13779
- Antonellis, A., Ellsworth, R. E., Sambuughin, N., Puls, I., Abel, A., Lee-Lin, S. Q., . . . Green, E. D. (2003). Glycyl tRNA synthetase mutations in Charcot-Marie-Tooth disease type 2D and distal spinal muscular atrophy type V. *Am J Hum Genet*, 72(5), 1293-1299. doi:10.1086/375039
- Aure, K., Dubourg, O., Jardel, C., Clarysse, L., Sternberg, D., Fournier, E., . . . Lombes, A. (2013). Episodic weakness due to mitochondrial DNA MT-ATP6/8 mutations. *Neurology*, 81(21), 1810-1818. doi:10.1212/01.wnl.0000436067.43384.0b
- Avila, R. L., D'Antonio, M., Bachi, A., Inouye, H., Feltri, M. L., Wrabetz, L., & Kirschner, D. A. (2010). P0 (protein zero) mutation S34C underlies instability of internodal myelin in S63C mice. *J Biol Chem*, 285(53), 42001-42012. doi:10.1074/jbc.M110.166967
- Banchs, I., Casasnovas, C., Alberti, A., De Jorge, L., Povedano, M., Montero, J., . . . Volpini, V. (2009). Diagnosis of Charcot-Marie-Tooth disease. *J Biomed Biotechnol*, 2009, 985415. doi:10.1155/2009/985415
- Bargiela, D., Shanmugarajah, P., Lo, C., Blakely, E. L., Taylor, R. W., Horvath, R., . . . Hadjivassiliou, M. (2015). Mitochondrial pathology in progressive cerebellar ataxia. *Cerebellum Ataxias*, 2, 16. doi:10.1186/s40673-015-0035-x
- Barreto, L. C., Oliveira, F. S., Nunes, P. S., de Franca Costa, I. M., Garcez, C. A., Goes, G. M., . . . de Souza Araujo, A. A. (2016). Epidemiologic Study of Charcot-Marie-Tooth Disease: A Systematic Review. *Neuroepidemiology*, 46(3), 157-165. doi:10.1159/000443706

- Bassam, B. A. (2014). Charcot-Marie-Tooth disease variants-classification, clinical, and genetic features and rational diagnostic evaluation. *J Clin Neuromuscul Dis*, 15(3), 117-128. doi:10.1097/CND.0000000000000020
- Boyer, O., Nevo, F., Plaisier, E., Funalot, B., Gribouval, O., Benoit, G., . . . Mollet, G. (2011). INF2 mutations in Charcot-Marie-Tooth disease with glomerulopathy. *N Engl J Med*, 365(25), 2377-2388. doi:10.1056/NEJ-Moa1109122
- Bombelli, F., Stojkovic, T., Dubourg, O., Echaniz-Laguna, A., Tardieu, S., Larcher, K., . . . Leguern, E. (2014). Charcot-Marie-Tooth disease type 2A: from typical to rare phenotypic and genotypic features. *JAMA Neurol*, 71(8), 1036-1042. doi:10.1001/jamaneurol.2014.629
- Bouillot, S., Martin-Negrier, M. L., Vital, A., Ferrer, X., Lagueny, A., Vincent, D., . . . Vita, C. (2002). Peripheral neuropathy associated with mitochondrial disorders: 8 cases and review of the literature. *J Peripher Nerv Syst*, 7(4), 213-220.
- Braathen, G. J. (2012). Genetic epidemiology of Charcot-Marie-Tooth disease. *Acta Neurol Scand Suppl* (193), iv-22. doi:10.1111/ane.12013
- Braathen, G. J., Sand, J. C., Lobato, A., Hoyer, H., & Russell, M. B. (2011). Genetic epidemiology of Charcot-Marie-Tooth in the general population. *Eur J Neurol*, 18(1), 39-48. doi:10.1111/j.1468-1331.2010.03037.x
- Brennan, K. M., Bai, Y., Pisciotta, C., Wang, S., Feely, S. M., Hoegger, M., . . . Shy, M. E. (2015). Absence of Dystrophin Related Protein-2 disrupts Cajal bands in a patient with Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromuscul Disord*, 25(10), 786-793. doi:10.1016/j.nmd.2015.07.001
- Capponi, S., Geroldi, A., Fossa, P., Grandis, M., Ciotti, P., Gulli, R., . . . Bellone, E. (2011). HSPB1 and HSPB8 in inherited neuropathies: study of an Italian cohort of dHMN and CMT2 patients. *J Peripher Nerv Syst*, 16(4), 287-294. doi:10.1111/j.1529-8027.2011.00361.x
- Chi, C. S. (2015). Diagnostic approach in infants and children with mitochondrial diseases. *Pediatr Neonatol*, 56(1), 7-18. doi:10.1016/j.pedneo.2014.03.009
- Cho, H. J., Sung, D. H., Kim, B. J., & Ki, C. S. (2007). Mitochondrial GT-Pase mitofusin 2 mutations in Korean patients with Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2. *Clin Genet*, 71(3), 267-272. doi:10.1111/j.1399-0004.2007.00763.x



- Chrestian, N., McMillan, H., Poulin, C., Campbell, C., & Vajsar, J. (2015). Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies in childhood: Case series and literature update. *Neuromuscul Disord*, 25(9), 693-698. doi:10.1016/j.nmd.2015.06.463
- Chua, S. Y., Lim, Y. W., Lam, K. S., Low, C. O. (2006). Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Singapore Med J*, 47, 625-626.
- Claeys, K. G., Zuchner, S., Kennerson, M., Berciano, J., Garcia, A., Verhoeven, K., . . . De Jonghe, P. (2009). Phenotypic spectrum of dynamin 2 mutations in Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Brain*, 132(Pt 7), 1741-1752. doi:10.1093/brain/awp115
- Colomban, C., Micallef, J., Lefebvre, M-N., Dubourg, O., Gonnaud, P-M., et al. (2014). Clinical spectrum and gender differences in a large cohort of Charcot-Marie-Tooth type 1A patients. *J Neurol Sci*, 336, 155-60.
- Colomer, J., Iturriaga, C., Bestue, M., Artuch, R., Briones, P., Montoya, J., . . . Pineda, M. (2000). [Aspects of neuropathy in mitochondrial diseases]. *Rev Neurol*, 30(12), 1117-1121.
- Davidson, G., Murphy, S., Polke, J., Laura, M., Salih, M., Muntoni, F., . . . Reilly, M. (2012). Frequency of mutations in the genes associated with hereditary sensory and autonomic neuropathy in a UK cohort. *J Neurol*, 259(8), 1673-1685. doi:10.1007/s00415-011-6397-y
- de Brito, O. M., & Scorrano, L. (2008). Mitofusin 2: a mitochondria-shaping protein with signaling roles beyond fusion. *Antioxid Redox Signal*, 10(3), 621-633. doi:10.1089/ars.2007.1934
- de Oliveira, A. P., Pereira, R. C., Onofre, P. T., Marques, V. D., de Andrade, G. B., Barreira, A. A., & Marques Junior, W. (2016). Clinical and neurophysiological features of the hereditary neuropathy with liability to pressure palsy due to the 17p11.2 deletion. *Arq Neuropsiquiatr*, 74(2), 99-105. doi:10.1590/0004-282X20160010
- de Vries, D. D., van Engelen, B. G., Gabreels, F. J., Ruitenbeek, W., & van Oost, B. A. (1993). A second missense mutation in the mitochondrial ATPase 6 gene in Leigh's syndrome. *Ann Neurol*, 34(3), 410-412. doi:10.1002/ana.410340319
- Dejerine, J. J., & Sottas, J. (1893). Sur la névrite interstitielle hypertrophique et progressive de l'enfance, affection souvent familiale et à debut infantile, caractérisée par une atrophie musculaire des extrémités, avec troubles marqués de la sensibilité et ataxie des mouvements et relevant d'une névrite

interstitielle hypertrophique a marche ascendante avec lésions médullaires consécutives. *Comptes rendus des séances de la Société de Biologie et de ses filiales*, 45(9. ser. tom. 5), 63-96.

- Dohrn, M. F., Glockle, N., Mulahasanovic, L., Heller, C., Mohr, J., Bauer, C., . . . Biskup, S. (2017). Frequent genes in rare diseases: panel-based next generation sequencing to disclose causal mutations in hereditary neuropathies. *J Neurochem*, 143(5), 507-522. doi:10.1111/jnc.14217
- England, J. D., Gronseth, G. S., Franklin, G., Carter, G. T., Kinsella, L. J., Cohen, J. A., . . . American Academy of, N. (2009). Practice Parameter: evaluation of distal symmetric polyneuropathy: role of autonomic testing, nerve biopsy, and skin biopsy (an evidence-based review). Report of the American Academy of Neurology, American Association of Neuromuscular and Electrodiagnostic Medicine, and American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation. *Neurology*, 72(2), 177-184. doi:10.1212/01.wnl.0000336345.70511.0f
- Evangelista, T., Bansagi, B., Pyle, A., Griffin, H., Douroudis, K., Polvickowski, T., . . . Horvath, R. (2015). Phenotypic variability of TRPV4 related neuropathies. *Neuromuscul Disord*, 25(6), 516-521. doi:10.1016/j.nmd.2015.03.007
- Farooq, M. U., Martin, J. H., & Andary, M. T. (2008). Unusual presentation of hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *J Brachial Plex Peripher Nerve Inj*, 3, 2. doi:10.1186/1749-7221-3-2
- Feely, S. M., Laura, M., Siskind, C. E., Sottile, S., Davis, M., Gibbons, V. S., . . . Shy, M. E. (2011). MFN2 mutations cause severe phenotypes in most patients with CMT2A. *Neurology*, 76(20), 1690-1696. doi:10.1212/WNL.0b013e31821a441e
- Finsterer, J. (2011). Inherited mitochondrial neuropathies. *J Neurol Sci*, 304(1-2), 9-16. doi:10.1016/j.jns.2011.02.012
- Flor-de-Lima, F., Macedo, L., Taipa, R., Melo-Pires, M., & Rodrigues, M. L. (2013). Hereditary neuropathy with liability to pressure palsy: a recurrent and bilateral foot drop case report. *Case Rep Pediatr*, 2013, 230541. doi:10.1155/2013/230541
- Foley, A. R., Menezes, M. P., Pandraud, A., Gonzalez, M. A., Al-Odaib, A., Abrams, A. J., . . . Houlden, H. (2014). Treatable childhood neuronopathy caused by mutations in riboflavin transporter RFVT2. *Brain*, 137(Pt 1), 44-56. doi:10.1093/brain/awt315

- Foley, C., Schofield, I., Eglon, G., Bailey, G., Chinnery, P. F., & Horvath, R. (2012). Charcot-Marie-Tooth disease in Northern England. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *83*(5), 572-573. doi:10.1136/jnnp-2011-300285
- Fridman, V., Bundy, B., Reilly, M. M., Pareyson, D., Bacon, C., Burns, J., . . . . Inherited Neuropathies, C. (2015). CMT subtypes and disease burden in patients enrolled in the Inherited Neuropathies Consortium natural history study: a cross-sectional analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *86*(8), 873-878. doi:10.1136/jnnp-2014-308826
- Fujii, T., Hattori, H., Higuchi, Y., Tsuji, M., & Mitsuyoshi, I. (1998). Phenotypic differences between T-->C and T-->G mutations at nt 8993 of mitochondrial DNA in Leigh syndrome. *Pediatr Neurol*, *18*(3), 275-277.
- Garcia-Sobrinho, T., Blanco-Arias, P., Palau, F., Espinos, C., Ramirez, L., Estela, A., . . . Pardo, J. (2017). Phenotypical features of a new dominant GDAP1 pathogenic variant (p.R226del) in axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromuscul Disord*, *27*(7), 667-672. doi:10.1016/j.nmd.2017.01.008
- Gess, B., Schirmacher, A., Boentert, M., & Young, P. (2013). Charcot-Marie-Tooth disease: frequency of genetic subtypes in a German neuromuscular center population. *Neuromuscul Disord*, *23*(8), 647-651. doi:10.1016/j.nmd.2013.05.005
- Goodwin, S., McPherson, J. D., & McCombie, W. R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*, *17*(6), 333-351. doi:10.1038/nrg.2016.49
- Grandis, M., Vigo, T., Passalacqua, M., Jain, M., Scazzola, S., La Padula, V., . . . Schenone, A. (2008). Different cellular and molecular mechanisms for early and late-onset myelin protein zero mutations. *Hum Mol Genet*, *17*(13), 1877-1889. doi:10.1093/hmg/ddn083
- Grigoryan, T., & Birchmeier, W. (2015). Molecular signaling mechanisms of axon-glia communication in the peripheral nervous system. *Bioessays*, *37*(5), 502-513. doi:10.1002/bies.201400172
- Grimm, D. G., Azencott, C. A., Aichele, F., Gieraths, U., MacArthur, D. G., Samocha, K. E., . . . Borgwardt, K. M. (2015). The evaluation of tools used to predict the impact of missense variants is hindered by two types of circularity. *Hum Mutat*, *36*(5), 513-523. doi:10.1002/humu.22768
- Guimaraes-Costa, R., Iancu Ferfoglia, R., Leonard-Louis, S., Ziegler, F., Magy, L., Fournier, E., . . . Stojkovic, T. (2017). Phenotypic spectrum of Charcot-Marie-Tooth disease due to LITAF/SIMPLE mutations: a study of 18 patients. *Eur J Neurol*, *24*(3), 530-538. doi:10.1111/ene.13239

- Hanemann, C. O., Bergmann, C., Senderek, J., Zerres, K., & Sperfeld, A. D. (2003). Transient, recurrent, white matter lesions in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease with novel connexin 32 mutation. *Arch Neurol*, *60*(4), 605-609. doi:10.1001/archneur.60.4.605
- Hegde, M., Santani, A., Mao, R., Ferreira-Gonzalez, A., Weck, K. E., & Voelkerding, K. V. (2017). Development and Validation of Clinical Whole-Exome and Whole-Genome Sequencing for Detection of Germline Variants in Inherited Disease. *Arch Pathol Lab Med*, *141*(6), 798-805. doi:10.5858/arpa.2016-0622-RA
- Horga, A., Cottenie, E., Tomaselli, P. J., Rojas-Garcia, R., Salvado, M., Villarreal-Perez, L., . . . Reilly, M. M. (2015). Absence of HINT1 mutations in a UK and Spanish cohort of patients with inherited neuropathies. *J Neurol*, *262*(8), 1984-1986. doi:10.1007/s00415-015-7851-z
- Horga, A., Laura, M., Jaunmuktane, Z., Jerath, N. U., Gonzalez, M. A., Polke, J. M., . . . Reilly, M. M. (2017). Genetic and clinical characteristics of NEFL-related Charcot-Marie-Tooth disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *88*(7), 575-585. doi:10.1136/jnnp-2016-315077
- Yum, S. W., Kleopa, K. A., Shumas, S., & Scherer, S. S. (2002). Diverse trafficking abnormalities of connexin32 mutants causing CMTX. *Neurobiol Dis*, *11*(1), 43-52.
- Jerath, N. U., Gutmann, L., Reddy, C. G., & Shy, M. E. (2016). Charcot-marie-tooth disease type 1X in women: Electrodiagnostic findings. *Muscle Nerve*, *54*(4), 728-732. doi:10.1002/mus.25077
- Jerath, N. U., & Shy, M. E. (2017). Charcot-Marie-Tooth disease type 1C: Clinical and electrophysiological findings for the c.334G>a (p.Gly112Ser) Litaf/Simple mutation. *Muscle Nerve*, *56*(6), 1092-1095. doi:10.1002/mus.25600
- Jordanova, A., De Jonghe, P., Boerkoel, C. F., Takashima, H., De Vriendt, E., Ceuterick, C., . . . Timmerman, V. (2003). Mutations in the neurofilament light chain gene (NEFL) cause early onset severe Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain*, *126*(Pt 3), 590-597.
- Kabzinska, D., Pierscinska, J., & Kochanski, A. (2009). Screening of the 17p11.2--p12 region in a large cohort of patients with Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease or hereditary neuropathy with liability to pressure palsies (HNPP). *J Appl Genet*, *50*(3), 283-288. doi:10.1007/BF03195684

- Karczewski, K. J., Weisburd, B., Thomas, B., Solomonson, M., Ruderfer, D. M., Kavanagh, D., . . . MacArthur, D. G. (2017). The ExAC browser: displaying reference data information from over 60 000 exomes. *Nucleic Acids Res*, *45*(D1), D840-D845. doi:10.1093/nar/gkw971
- Karppa, M., Syrjala, P., Tolonen, U., & Majamaa, K. (2003). Peripheral neuropathy in patients with the 3243A>G mutation in mitochondrial DNA. *J Neurol*, *250*(2), 216-221. doi:10.1007/s00415-003-0981-8
- Kassubek, J., Bretschneider, V., & Sperfeld, A. D. (2005). Corticospinal tract MRI hyperintensity in X-linked Charcot-Marie-Tooth Disease. *J Clin Neurosci*, *12*(5), 588-589. doi:10.1016/j.jocn.2004.07.020
- Kaufmann, P., Pascual, J. M., Anziska, Y., Gooch, C. L., Engelstad, K., Jhung, S., . . . De Vivo, D. C. (2006). Nerve conduction abnormalities in patients with MELAS and the A3243G mutation. *Arch Neurol*, *63*(5), 746-748. doi:10.1001/archneur.63.5.746
- Kyriakoudi, S., Sargiannidou, I., Kagiava, A., Olympiou, M., & Kleopa, K. A. (2017). Golgi-retained Cx32 mutants interfere with gene addition therapy for CMT1X. *Hum Mol Genet*, *26*(9), 1622-1633. doi:10.1093/hmg/ddx064
- Klein, C. J., Duan, X., & Shy, M. E. (2013). Inherited neuropathies: clinical overview and update. *Muscle Nerve*, *48*(4), 604-622. doi:10.1002/mus.23775
- Kleopa, K. A., Yum, S. W., & Scherer, S. S. (2002). Cellular mechanisms of connexin32 mutations associated with CNS manifestations. *J Neurosci Res*, *68*(5), 522-534. doi:10.1002/jnr.10255
- Kleopa, K. A., & Sargiannidou, I. (2015). Connexins, gap junctions and peripheral neuropathy. *Neurosci Lett*, *596*, 27-32. doi:10.1016/j.neulet.2014.10.033
- Kleopa, K. A., Zamba-Papanicolaou, E., Alevra, X., Nicolaou, P., Georgiou, D. M., Hadjisavvas, A., . . . Christodoulou, K. (2006). Phenotypic and cellular expression of two novel connexin32 mutations causing CMT1X. *Neurology*, *66*(3), 396-402. doi:10.1212/01.wnl.0000196479.93722.59
- Lassuthova, P., Brozkova, D. S., Krutova, M., Neupauerova, J., Haberlova, J., Mazanec, R., . . . Seeman, P. (2015). Mutations in HINT1 are one of the most frequent causes of hereditary neuropathy among Czech patients and neuromyotonia is rather an underdiagnosed symptom. *Neurogenetics*, *16*(1), 43-54. doi:10.1007/s10048-014-0427-8

- Liao, Y. C., Tsai, P. C., Lin, T. S., Hsiao, C. T., Chao, N. C., Lin, K. P., & Lee, Y. C. (2017). Clinical and Molecular Characterization of PMP22 point mutations in Taiwanese patients with Inherited Neuropathy. *Sci Rep*, 7(1), 15363. doi:10.1038/s41598-017-14771-5
- Liu, L., Li, X. B., Hu, Z. H. M., Zi, X. H., Zhao, X., Xie, Y. Z., . . . Zhang, R. X. (2017). Phenotypes and cellular effects of GJB1 mutations causing CMT1X in a cohort of 226 Chinese CMT families. *Clin Genet*, 91(6), 881-891. doi:10.1111/cge.12913
- Lott, M. T., Leipzig, J. N., Derbeneva, O., Xie, H. M., Chalkia, D., Sarmady, M., . . . Wallace, D. C. (2013). mtDNA Variation and Analysis Using Mitomap and Mitomaster. *Curr Protoc Bioinformatics*, 44, 1 23 21-26. doi:10.1002/0471250953.bi0123s44
- Luigetti, M., Del Grande, A., Conte, A., Lo Monaco, M., Bisogni, G., Romano, A., . . . Sabatelli, M. (2014). Clinical, neurophysiological and pathological findings of HNPP patients with 17p12 deletion: a single-centre experience. *J Neurol Sci*, 341(1-2), 46-50. doi:10.1016/j.jns.2014.03.046
- Luigetti, M., Sauchelli, D., Primiano, G., Cuccagna, C., Bernardo, D., Lo Monaco, M., & Servidei, S. (2016). Peripheral neuropathy is a common manifestation of mitochondrial diseases: a single-centre experience. *Eur J Neurol*, 23(6), 1020-1027. doi:10.1111/ene.12954
- Mancuso, M., Orsucci, D., Angelini, C., Bertini, E., Carelli, V., Comi, G. P., . . . Siciliano, G. (2014). The m.3243A>G mitochondrial DNA mutation and related phenotypes. A matter of gender? *J Neurol*, 261(3), 504-510. doi:10.1007/s00415-013-7225-3
- Mancuso, M., Orsucci, D., Angelini, C., Bertini, E., Carelli, V., Comi, G. P., . . . Siciliano, G. (2016). "Mitochondrial neuropathies": A survey from the large cohort of the Italian Network. *Neuromuscul Disord*, 26(4-5), 272-276. doi:10.1016/j.nmd.2016.02.008
- Mandich, P., Fossa, P., Capponi, S., Geroldi, A., Acquaviva, M., Gulli, R., . . . Bellone, E. (2009). Clinical features and molecular modelling of novel MPZ mutations in demyelinating and axonal neuropathies. *Eur J Hum Genet*, 17(9), 1129-1134. doi:10.1038/ejhg.2009.37
- Manganelli, F., Tozza, S., Pisciotta, C., Bellone, E., Iodice, R., Nolano, M., . . . Santoro, L. (2014). Charcot-Marie-Tooth disease: frequency of genetic subtypes in a Southern Italy population. *J Peripher Nerv Syst*, 19(4), 292-298. doi:10.1111/jns.12092

- Mathis, S., Goizet, C., Tazir, M., Magdelaine, C., Lia, A. S., Magy, L., & Vallat, J. M. (2015). Charcot-Marie-Tooth diseases: an update and some new proposals for the classification. *J Med Genet*, *52*(10), 681-690. doi:10.1136/jmedgenet-2015-103272
- McLaren, W., Gil, L., Hunt, S. E., Riat, H. S., Ritchie, G. R., Thormann, A., . . . Cunningham, F. (2016). The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol*, *17*(1), 122. doi:10.1186/s13059-016-0974-4
- Mersiyanova, I. V., Ismailov, S. M., Polyakov, A. V., Dadali, E. L., Fedotov, V. P., Nelis, E., . . . Evgrafov, O. V. (2000). Screening for mutations in the peripheral myelin genes PMP22, MPZ and Cx32 (GJB1) in Russian Charcot-Marie-Tooth neuropathy patients. *Hum Mutat*, *15*(4), 340-347. doi:10.1002/(SICI)1098-1004(200004)15:4<340::AID-HUMU6>3.0.CO;2-Y
- Milley, G. M., Varga, E. T., Grosz, Z., Nemes, C., Aranyi, Z., Boczan, J., . . . Gal, A. (2018). Genotypic and phenotypic spectrum of the most common causative genes of Charcot-Marie-Tooth disease in Hungarian patients. *Neuromuscul Disord*, *28*(1), 38-43. doi:10.1016/j.nmd.2017.08.007
- Morava, E., van den Heuvel, L., Hol, F., de Vries, M.C., Hogeveen, M., Rodenburg, R.J., Smeitink, J.A.M. (2006). Mitochondrial disease criteria: diagnostic applications in children. *Neurol*, *67*, 1823-1826. doi: 10.1212/01.wnl.0000244435.27645.54
- Murphy, S. M., Laura, M., Fawcett, K., Pandraud, A., Liu, Y. T., Davidson, G. L., . . . Reilly, M. M. (2012). Charcot-Marie-Tooth disease: frequency of genetic subtypes and guidelines for genetic testing. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *83*(7), 706-710. doi:10.1136/jnnp-2012-302451
- Naess, K., Freyer, C., Bruhn, H., Wibom, R., Malm, G., Nennesmo, I., . . . Larsson, N. G. (2009). MtDNA mutations are a common cause of severe disease phenotypes in children with Leigh syndrome. *Biochim Biophys Acta*, *1787*(5), 484-490. doi:10.1016/j.bbabi.2008.11.014
- Nelis, E., Timmerman, V., De Jonghe, P., & Van Broeckhoven, C. (1994). Identification of a 5' splice site mutation in the PMP-22 gene in autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease type 1. *Hum Mol Genet*, *3*(3), 515-516.
- Nelis, E., Van Broeckhoven, C., De Jonghe, P., Lofgren, A., Vandenberghe, A., Latour, P., . . . et al. (1996). Estimation of the mutation frequencies in Charcot-Marie-Tooth disease type 1 and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies: a European collaborative study. *Eur J Hum Genet*, *4*(1), 25-33.



- Niemann, A., Wagner, K. M., Ruegg, M., & Suter, U. (2009). GDAP1 mutations differ in their effects on mitochondrial dynamics and apoptosis depending on the mode of inheritance. *Neurobiol Dis*, *36*(3), 509-520. doi:10.1016/j.nbd.2009.09.011
- Numakura, C., Lin, C., Ikegami, T., Guldberg, P., & Hayasaka, K. (2002). Molecular analysis in Japanese patients with Charcot-Marie-Tooth disease: DGGE analysis for PMP22, MPZ, and Cx32/GJB1 mutations. *Hum Mutat*, *20*(5), 392-398. doi:10.1002/humu.10134
- Ostern, R., Fagerheim, T., Hjellnes, H., Nygard, B., Mellgren, S. I., & Nilsen, O. (2013). Diagnostic laboratory testing for Charcot Marie Tooth disease (CMT): the spectrum of gene defects in Norwegian patients with CMT and its implications for future genetic test strategies. *BMC Med Genet*, *14*, 94. doi:10.1186/1471-2350-14-94
- Paprocka, J., Kajor, M., Jamroz, E., Jezela-Stanek, A., Seeman, P., Marszal, E. (2006). Hereditary neuropathy with liability to pressure palsy. *Folia Neuropathol*, *44*, 290-294.
- Pareyson, D., Piscoquito, G., Moroni, I., Salsano, E., & Zeviani, M. (2013). Peripheral neuropathy in mitochondrial disorders. *Lancet Neurol*, *12*(10), 1011-1024. doi:10.1016/S1474-4422(13)70158-3
- Patel, S. V. K. R. S. Y. B. A. (2018). Distal Hereditary Motor Neuropathy *Neuromuscular Disorders* (pp. 534): Springer Singapore.
- Pentao, L., Wise, C. A., Chinault, A. C., Patel, P. I., & Lupski, J. R. (1992). Charcot-Marie-Tooth type 1A duplication appears to arise from recombination at repeat sequences flanking the 1.5 Mb monomer unit. *Nat Genet*, *2*(4), 292-300. doi:10.1038/ng1292-292
- Pitceathly, R. D., Murphy, S. M., Cottenie, E., Chalasani, A., Sweeney, M. G., Woodward, C., . . . Hanna, M. G. (2012). Genetic dysfunction of MT-ATP6 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology*, *79*(11), 1145-1154. doi:10.1212/WNL.0b013e3182698d8d
- Rahman, S., Blok, R. B., Dahl, H. H., Danks, D. M., Kirby, D. M., Chow, C. W., . . . Thorburn, D. R. (1996). Leigh syndrome: clinical features and biochemical and DNA abnormalities. *Ann Neurol*, *39*(3), 343-351. doi:10.1002/ana.410390311
- Reilly, M. M., Murphy, S. M., & Laura, M. (2011). Charcot-Marie-Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst*, *16*(1), 1-14. doi:10.1111/j.1529-8027.2011.00324.x



- Ron, D., & Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(7), 519-529. doi:10.1038/nrm2199
- Rossor, A. M., Kalmar, B., Greensmith, L., & Reilly, M. M. (2012). The distal hereditary motor neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 83(1), 6-14. doi:10.1136/jnnp-2011-300952
- Rossor, A. M., Polke, J. M., Houlden, H., & Reilly, M. M. (2013). Clinical implications of genetic advances in Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Rev Neurol*, 9(10), 562-571. doi:10.1038/nrneurol.2013.179
- Rossor, A. M., Tomaselli, P. J., & Reilly, M. M. (2016). Recent advances in the genetic neuropathies. *Curr Opin Neurol*, 29(5), 537-548. doi:10.1097/WCO.0000000000000373
- Rotthier, A., Auer-Grumbach, M., Janssens, K., Baets, J., Penno, A., Almeida-Souza, L., . . . Timmerman, V. (2010). Mutations in the SPTLC2 subunit of serine palmitoyltransferase cause hereditary sensory and autonomic neuropathy type I. *Am J Hum Genet*, 87(4), 513-522. doi:10.1016/j.ajhg.2010.09.010
- Rouzier, C., Bannwarth, S., Chaussonot, A., Chevrollier, A., Verschueren, A., Bonello-Palot, N., . . . Paquis-Flucklinger, V. (2012). The MFN2 gene is responsible for mitochondrial DNA instability and optic atrophy ,plus phenotype. *Brain*, 135(Pt 1), 23-34. doi:10.1093/brain/awr323
- Rudnik-Schoneborn, S., Auer-Grumbach, M., & Senderek, J. (2017). Hereditary Neuropathies: Update 2017. *Neuropediatrics*, 48(4), 282-293. doi:10.1055/s-0037-1603518
- Rudnik-Schoneborn, S., Tolle, D., Senderek, J., Eggermann, K., Elbracht, M., Kornak, U., . . . Zerres, K. (2016). Diagnostic algorithms in Charcot-Marie-Tooth neuropathies: experiences from a German genetic laboratory on the basis of 1206 index patients. *Clin Genet*, 89(1), 34-43. doi:10.1111/cge.12594
- Santani, A., Murrell, J., Funke, B., Yu, Z., Hegde, M., Mao, R., . . . Weck, K. E. (2017). Development and Validation of Targeted Next-Generation Sequencing Panels for Detection of Germline Variants in Inherited Diseases. *Arch Pathol Lab Med*, 141(6), 787-797. doi:10.5858/arpa.2016-0517-RA
- Saporta, A. S., Sottile, S. L., Miller, L. J., Feely, S. M., Siskind, C. E., & Shy, M. E. (2011). Charcot-Marie-Tooth disease subtypes and genetic testing strategies. *Ann Neurol*, 69(1), 22-33. doi:10.1002/ana.22166

- Saporta, M. A., Shy, B. R., Patzko, A., Bai, Y., Pennuto, M., Ferri, C., . . . Shy, M. E. (2012). MpzR98C arrests Schwann cell development in a mouse model of early-onset Charcot-Marie-Tooth disease type 1B. *Brain*, *135*(Pt 7), 2032-2047. doi:10.1093/brain/aws140
- Saporta, M. A., & Shy, M. E. (2013). Inherited peripheral neuropathies. *Neurolog Clin*, *31*(2), 597-619. doi:10.1016/j.ncl.2013.01.009
- Scherer, S. S., & Kleopa, K. A. (2012). X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst*, *17 Suppl 3*, 9-13. doi:10.1111/j.1529-8027.2012.00424.x
- Scherer, S. S., & Wrabetz, L. (2008). Molecular mechanisms of inherited demyelinating neuropathies. *Glia*, *56*(14), 1578-1589. doi:10.1002/glia.20751
- Shapiro, L., Doyle, J. P., Hensley, P., Colman, D. R., & Hendrickson, W. A. (1996). Crystal structure of the extracellular domain from P0, the major structural protein of peripheral nerve myelin. *Neuron*, *17*(3), 435-449.
- Shy, M. E. (2006). Peripheral neuropathies caused by mutations in the myelin protein zero. *J Neurol Sci*, *242*(1-2), 55-66. doi:10.1016/j.jns.2005.11.015
- Shy, M. E., Jani, A., Krajewski, K., Grandis, M., Lewis, R. A., Li, J., . . . Kamholz, J. (2004). Phenotypic clustering in MPZ mutations. *Brain*, *127*(Pt 2), 371-384. doi:10.1093/brain/awh048
- Shy, M. E., Siskind, C., Swan, E. R., Krajewski, K. M., Doherty, T., Furst, D. R., . . . Hahn, A. F. (2007). CMT1X phenotypes represent loss of GJB1 gene function. *Neurology*, *68*(11), 849-855. doi:10.1212/01.wnl.0000256709.08271.4d
- Silvestri, G., Moraes, C. T., Shanske, S., Oh, S. J., & DiMauro, S. (1992). A new mtDNA mutation in the tRNA(Lys) gene associated with myoclonic epilepsy and ragged-red fibers (MERRF). *Am J Hum Genet*, *51*(6), 1213-1217.
- Singaravelu, K., Nelson, C., Bakowski, D., de Brito, O. M., Ng, S. W., Di Capite, J., . . . Parekh, A. B. (2011). Mitofusin 2 regulates STIM1 migration from the Ca<sup>2+</sup> store to the plasma membrane in cells with depolarized mitochondria. *J Biol Chem*, *286*(14), 12189-12201. doi:10.1074/jbc.M110.174029
- Synofzik, M., Schicks, J., Wilhelm, C., Bornemann, A., & Schols, L. (2012). Charcot-Marie-Tooth hereditary neuropathy due to a mitochondrial ATP6 mutation. *Eur J Neurol*, *19*(10), e114-116. doi:10.1111/j.1468-1331.2012.03812.x

- Siskind, C., Feely, S. M., Bernes, S., Shy, M. E., & Garbern, J. Y. (2009). Persistent CNS dysfunction in a boy with CMT1X. *J Neurol Sci*, *279*(1-2), 109-113. doi:10.1016/j.jns.2008.12.031
- Siskind, C. E., Murphy, S. M., Ovens, R., Polke, J., Reilly, M. M., & Shy, M. E. (2011). Phenotype expression in women with CMT1X. *J Peripher Nerv Syst*, *16*(2), 102-107. doi:10.1111/j.1529-8027.2011.00332.x
- Siskind, C. E., Panchal, S., Smith, C. O., Feely, S. M., Dalton, J. C., Schindler, A. B., & Krajewski, K. M. (2013). A review of genetic counseling for Charcot Marie Tooth disease (CMT). *J Genet Couns*, *22*(4), 422-436. doi:10.1007/s10897-013-9584-4
- Sivakumar, K., Kyriakides, T., Puls, I., Nicholson, G. A., Funalot, B., Antonellis, A., . . . Goldfarb, L. G. (2005). Phenotypic spectrum of disorders associated with glycyI-tRNA synthetase mutations. *Brain*, *128*(Pt 10), 2304-2314. doi:10.1093/brain/awh590
- Sivera, R., Sevilla, T., Vilchez, J. J., Martinez-Rubio, D., Chumillas, M. J., Vazquez, J. F., . . . Espinos, C. (2013). Charcot-Marie-Tooth disease: genetic and clinical spectrum in a Spanish clinical series. *Neurology*, *81*(18), 1617-1625. doi:10.1212/WNL.0b013e3182a9f56a
- Spagnoli, C., Iodice, A., Salerno, G. G., Frattini, D., Bertani, G., Fusco, C. (2016). Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies in childhood: case series and literature update. *Neuromuscul Disord*, *26*:394.
- Spitalieri, P., Talarico, V. R., Murdocca, M., Novelli, G., & Sangiuolo, F. (2016). Human induced pluripotent stem cells for monogenic disease modelling and therapy. *World J Stem Cells*, *8*(4), 118-135. doi:10.4252/wjsc.v8.i4.118
- Stenson, P. D., Mort, M., Ball, E. V., Shaw, K., Phillips, A., & Cooper, D. N. (2014). The Human Gene Mutation Database: building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. *Hum Genet*, *133*(1), 1-9. doi:10.1007/s00439-013-1358-4
- Tatuch, Y., Christodoulou, J., Feigenbaum, A., Clarke, J. T., Wherret, J., Smith, C., . . . Robinson, B. H. (1992). Heteroplasmic mtDNA mutation (T---G) at 8993 can cause Leigh disease when the percentage of abnormal mtDNA is high. *Am J Hum Genet*, *50*(4), 852-858.
- Timmerman, V., De Jonghe, P., Spoelders, P., Simokovic, S., Lofgren, A., Nelis, E., . . . Van Broeckhoven, C. (1996). Linkage and mutation analysis

- of Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2 families with chromosomes 1p35-p36 and Xq13. *Neurology*, 46(5), 1311-1318.
- Vaeth, S., Vaeth, M., Andersen, H., Christensen, R., & Jensen, U. B. (2017). Charcot-Marie-Tooth disease in Denmark: a nationwide register-based study of mortality, prevalence and incidence. *BMJ Open*, 7(11), e018048. doi:10.1136/bmjopen-2017-018048
- Van Den Bosch, L., & Timmerman, V. (2006). Genetics of motor neuron disease. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 6(5), 423-431.
- van Paassen, B. W., van der Kooi, A. J., van Spaendonck-Zwarts, K. Y., Verhamme, C., Baas, F., & de Visser, M. (2014). PMP22 related neuropathies: Charcot-Marie-Tooth disease type 1A and Hereditary Neuropathy with liability to Pressure Palsies. *Orphanet J Rare Dis*, 9, 38. doi:10.1186/1750-1172-9-38
- Vance, J. M. (2000). The many faces of Charcot-Marie-Tooth disease. *Arch Neurol*, 57(5), 638-640.
- Verhamme, C., van Schaik, I. N., Koelman, J. H., de Haan, R. J., & de Visser, M. (2009). The natural history of Charcot-Marie-Tooth type 1A in adults: a 5-year follow-up study. *Brain*, 132(Pt 12), 3252-3262. doi:10.1093/brain/awp251
- Verhoeven, K., Claeys, K. G., Zuchner, S., Schroder, J. M., Weis, J., Ceuterick, C., . . . Timmerman, V. (2006). MFN2 mutation distribution and genotype/phenotype correlation in Charcot-Marie-Tooth type 2. *Brain*, 129(Pt 8), 2093-2102. doi:10.1093/brain/awl126
- Verhoeven, K., De Jonghe, P., Coen, K., Verpoorten, N., Auer-Grumbach, M., Kwon, J. M., . . . Timmerman, V. (2003). Mutations in the small GTP-ase late endosomal protein RAB7 cause Charcot-Marie-Tooth type 2B neuropathy. *Am J Hum Genet*, 72(3), 722-727. doi:10.1086/367847
- Wang, K., Li, M., & Hakonarson, H. (2010). ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res*, 38(16), e164. doi:10.1093/nar/gkq603
- Watts, J. K., & Corey, D. R. (2012). Silencing disease genes in the laboratory and the clinic. *J Pathol*, 226(2), 365-379. doi:10.1002/path.2993
- Wedderburn, S., Pateria, P., Panegyres, P. K. (2014). Hereditary Neuropathy with Liability to Pressure Palsy Presenting as an Acute Brachial Plexopathy: A Lover's Palsy. *Case Rep Neurol*, 6, 281-286. doi: 10.1159/000369921

- Zuchner, S., De Jonghe, P., Jordanova, A., Claeys, K. G., Guergueltcheva, V., Cherninkova, S., . . . Vance, J. M. (2006). Axonal neuropathy with optic atrophy is caused by mutations in mitofusin 2. *Ann Neurol*, *59*(2), 276-281. doi:10.1002/ana.20797
- Zuchner, S., Mersiyanova, I. V., Muglia, M., Bissar-Tadmouri, N., Rochelle, J., Dadali, E. L., . . . Vance, J. M. (2004). Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet*, *36*(5), 449-451. doi:10.1038/ng1341
- Zuchner, S., & Vance, J. M. (2006). Molecular genetics of autosomal-dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med*, *8*(1-2), 63-74. doi:10.1385/NMM:8:1:63

## PRIEDAI

### 1 priedas. Mitochondrinų ligų diagnostiniai kriterijai

<b>I. Klinikiniai požymiai ir simptomai, 1 balas / simptomai (maks. 4 balai)</b>		<b>II. Metabolitų / vaizdo analizės tyrimai (maks. 4 balai)</b>	<b>III. Raumens morfologija (maks. 4 balai)</b>
A. Raumenų simptomai (maks. 2 balai)	B. CNS simptomai (maks. 2 balai)		
Oftalmoplegija*	Raidos sutrikimas / vėlavimas	Kraujas	Padidėjusi laktato konc.* Raudonos netolygios / mėlynos skaidulos**
Miopatinis veidas	Įgytų įgūdžių praradimas	Virškinamasis traktas	Padidėjęs laktato/piruvato santykis COX neigiamos skaidulos**
Fizinės veiklos netoleravimas	Į insultą panašūs epizodai	Endokrininė sistema / augimas	Padidėjusi alanino konc.* Silpnas SDH dažymas
Raumenų silpnumas	Migrena	Širdis	SDH teigiamos kraujagyslės*
Rabdomiolizė	Traukuliai	Inkstai	Pakitusios mitochondrijos / EM*
Pakitimai EMG	Mioklonijos	Rega	
	Regos praradimas	Klausa	
	Piramidiniai simptomai	Neuropatija	
	Ekstrapiramidiniai simptomai	Šeiminė liga	
	Smegenų kamieno pažeidimo simptomai	Leigh sindromas / MRT*	
		Padidėjęs laktatas / MRS	

*Paiskinimai:* \* – 2 balai, \*\* – 4 balai, EMG – elektromiografija, TKR – trikarboksirūgštys, COX – citochromo c oksidazė, SDH – sukcinato dehidrogenazė. Adaptuota pagal Morava ir aut., 2006.

**2 priedas. Tikslinio 150-ties genų rinkinio sąrašas**

<b>Nr.</b>	<b>Genas</b>	<b>OMIM</b>
1	<i>AAAS</i>	605378
2	<i>AARS</i>	601065
3	<i>ABCD1</i>	300371
4	<i>ACO2</i>	100850
5	<i>ACOX1</i>	609751
6	<i>ADGRG1</i>	604110
7	<i>AFG3L2</i>	604581
8	<i>AIFM1</i>	300169
9	<i>ALDH3A2</i>	609523
10	<i>ALDH6A1</i>	603178
11	<i>ALG2</i>	607905
12	<i>AMPD2</i>	102771
13	<i>AP1S2</i>	300629
14	<i>AP3D1</i>	607246
15	<i>AP4M1</i>	602296
16	<i>APTX</i>	606350
17	<i>ARHGEF10</i>	608136
18	<i>ARNT2</i>	606036
19	<i>ARSA</i>	607574
20	<i>ASNS</i>	108370
21	<i>ASPA</i>	608034
22	<i>ATAD3A</i>	612316
23	<i>ATP13A2</i>	610513
24	<i>ATP7B</i>	606882
25	<i>B4GALNT1</i>	601873
26	<i>BAG3</i>	603883
27	<i>BSCL2</i>	606158
28	<i>C10ORF2</i>	606075
29	<i>C12orf65</i>	613541
30	<i>C19orf12</i>	614297
31	<i>CYP2U1</i>	610670
32	<i>CLP1</i>	608757
33	<i>CSF1R</i>	164770
34	<i>DARS2</i>	610956
35	<i>DDHD1</i>	614603
36	<i>DDOST</i>	602202
37	<i>DGUOK</i>	601465
38	<i>DHFR</i>	126060
39	<i>DHTKD1</i>	614984
40	<i>DYNC1H1</i>	600112
41	<i>DNM1L</i>	603850
42	<i>DNM2</i>	602378

**2 priedo 1 tęsinys**

<b>Nr.</b>	<b>Genas</b>	<b>OMIM</b>
43	<i>DPM1</i>	603503
44	<i>EGR2</i>	129010
45	<i>ELOVL4</i>	605512
46	<i>ERCC3</i>	133510
47	<i>ERCC6</i>	609413
48	<i>ERCC8</i>	609412
49	<i>EXOSC3</i>	606489
50	<i>FBLN5</i>	604580
51	<i>FGF14</i>	601515
52	<i>FIG4</i>	609390
53	<i>FLVCR1</i>	609144
54	<i>FOLR1</i>	136430
55	<i>FOXP1</i>	605515
56	<i>FTL</i>	134790
57	<i>GAA</i>	606800
58	<i>GABRB3</i>	137192
59	<i>GALC</i>	606890
60	<i>GAN</i>	605379
61	<i>GARS</i>	600287
62	<i>GBE1</i>	607839
63	<i>GDAP1</i>	606598
64	<i>GIF</i>	609342
65	<i>GJB1</i>	304040
66	<i>GLUL</i>	138290
67	<i>GNB4</i>	610863
68	<i>HADHB</i>	143450
69	<i>HARS</i>	142810
70	<i>HINT1</i>	601314
71	<i>HK1</i>	142600
72	<i>HSD17B4</i>	601860
73	<i>HSPB1</i>	602195
74	<i>HSPB8</i>	608014
75	<i>HTRA1</i>	602194
76	<i>YARS</i>	603623
77	<i>IARS2</i>	612801
78	<i>IER3IP1</i>	609382
79	<i>IGHMBP2</i>	600502
80	<i>INF2</i>	610982
81	<i>ITPA</i>	147520
82	<i>KIF1B</i>	605995
83	<i>LITAF</i>	603795
84	<i>LMNA</i>	150330



**2 priedo 2 tęsinys**

<b>Nr.</b>	<b>Genas</b>	<b>OMIM</b>
85	<i>LRSAMI</i>	610933
86	<i>MANBA</i>	609489
87	<i>MARS</i>	156560
88	<i>MAT1A</i>	610550
89	<i>MFN2</i>	608507
90	<i>MME</i>	120520
91	<i>MOCS1</i>	603707
92	<i>MOCS2</i>	603708
93	<i>MPZ</i>	159440
94	<i>MRPS22</i>	605810
95	<i>MTMR2</i>	603557
96	<i>MTTP</i>	157147
97	<i>NAGA</i>	104170
98	<i>NAGLU</i>	609701
99	<i>NARS2</i>	612803
100	<i>NEFL</i>	162280
101	<i>OPA1</i>	605290
102	<i>PC</i>	608786
103	<i>PDYN</i>	131340
104	<i>PDK3</i>	300906
105	<i>PEX10</i>	602859
106	<i>PEX11B</i>	603867
107	<i>PEX16</i>	603360
108	<i>PEX19</i>	600279
109	<i>PEX2</i>	170993
110	<i>PEX5</i>	600414
111	<i>PEX7</i>	601757
112	<i>PGM3</i>	172100
113	<i>PHGDH</i>	606879
114	<i>PIGV</i>	610274
115	<i>PLA2G6</i>	603604
116	<i>PMP22</i>	601097
117	<i>PRICKLE1</i>	608500
118	<i>PRMT7</i>	610087
119	<i>PRPS1</i>	311850
120	<i>PRX</i>	605725
121	<i>PSAP</i>	176801
122	<i>RAB7A</i>	602298
123	<i>RMND1</i>	614917
124	<i>SBF1</i>	603560
125	<i>SBF2</i>	607697
126	<i>SEPT9</i>	604061

**2 priedo 3 tęsinys**

<b>Nr.</b>	<b>Genas</b>	<b>OMIM</b>
127	<i>SH3TC2</i>	608206
128	<i>SLC12A6</i>	604878
129	<i>SLC16A2</i>	300095
130	<i>SLC25A12</i>	603667
131	<i>SLC25A19</i>	606521
132	<i>SLC25A22</i>	609302
133	<i>SLC35A2</i>	314375
134	<i>SLC52A2</i>	607882
135	<i>SLC6A8</i>	300036
136	<i>SPG11</i>	610844
137	<i>SUCLA2</i>	603921
138	<i>SUMF1</i>	607939
139	<i>TBC1D24</i>	613577
140	<i>TDP1</i>	607198
141	<i>TFG</i>	602498
142	<i>TMEM126A</i>	612988
143	<i>TRIM2</i>	614141
144	<i>TRPV4</i>	605427
145	<i>TSFM</i>	604723
146	<i>TTR</i>	176300
147	<i>TUBB3</i>	602661
148	<i>VCP</i>	601023
149	<i>ZC4H2</i>	300897
150	<i>ZNF335</i>	610827

## PADEKA

„Geriau keliauti su draugu naktį  
nei vienišam dieną“

*(Helen Keller)*

Aš dėkoju pacientams, kuriuos sutikau klinikinio darbo metu ir kurie pasitikėjo manimi. Tikiuosi, kad šis darbas gali padėti tolesniems tyrimams ir yra svarbus organizuojant geresnę priežiūrą asmens sveikatos priežiūros įstaigose.

Doktorantūros studijos – ne tik iškelto tikslo įgyvendinimas. Tai skaudžių nusivylimų, sunkumų, džiaugsmo, pagarbos, kantrybės reikalaujanti patirtis, kuri neįmanoma be daugybės žmonių pagalbos ir palaikymo.

Pirmiausia noriu padėkoti savo darbo vadovui prof. Algirdui Utkui už suteiktą galimybę atlikti šį darbą, už jo gerumą, pasitikėjimą, pagalbą, nepaisant itin užimto grafiko ir daugybės atsakomybių, už klinikiškus įgūdžius. Profesoriaus pasitikėjimas buvo įkvepiantis, jo žinios ir empatija įtraukė mane į neuroraumeninių ligų sritį, be kurios dabar neįsivaizduoju savo klinikinės veiklos. Aš nepaprastai vertinu suteiktą galimybę augti kaip asmenybei, tiek profesionaliai, tiek asmeniškai.

Dėkoju akademikui profesoriui Vaidučiui Kučinskui už palaikymą, vertingas mokslines pastabas, paskatinimą ir išvalgas.

Ypatinga mano padėka skirta doc. dr. Laimai Ambrozaitytei už savaitgalius ir vakarus laboratorijoje, už mokslines interpretacijas, disertacijos rankraščio ir santraukos peržiūrą, kantrybę ir supratingumą, už draugišką ir nuoširdų palaikymą.

Visai mitochondrinių ligų tyrimo grupei – Kristinai Grigalionienei, Gabrielei Žukauskaitei bei Danutei Vansevičiūtei Lietuvoje ir dr. Innai Inashkinai, Ditai Pelnai Latvijoje – dėkoju už bendrą darbą ir įgyvendintą tikslą. Taip pat šilta padėka dr. Baibai Lace už paskatinimą ir palaikymą.

Nuoširdžiai dėkoju doc. dr. Almai Molytei už visokeriopą pagalbą rašant šį darbą.

Už idėjas ir patarimus esu labai dėkinga dr. Aušrai Morkūnienei, už pagalbą atliekant tyrimus ir rezultatų vizualinį pateikimą dėkoju Karoliui Baronui. Dr. Tautvydui Rančeliui dėkoju už tai, kad niekada neatsisakė patikrinti mano gautų rezultatų vertinimą. Už disertacijos rankraščio peržiūrą ir pastabas dėkoju dr. Ingridai Domarkienei.

Noriu padėkoti visiems Genetinio konsultavimo ir registro skyriaus bei Molekulinės genetikos laboratorijos kolegoms: be Jūsų indėlio šis darbas nebūtų toks, koks yra.

Dėkoju Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų gydytojams neurologams, ypač dr. Arūnui Vaitkevičiui, dr. Ievai Sereikei ir Ingai Maculevičienei.

Nuoširdžiai dėkoju retų vaikų ligų gydytojai dr. Birutei Skerlienei už praktines ir mokslines pastabas, pacientų aptarimus. Gydytojai vaikų neurologei Rasai Abelytei – už rezultatyvias diskusijas.

Dėkoju gydytojai Deimantei Braždžiūnaitei už meninę disertacijos apipavidalinimą ir pagalbą redaguojant disertacijos rankraštį.

Už draugišką palaikymą ir domėjimąsi, kaip sekasi, dėkoju visiems Neonatologijos centro gydytojams ir kitiems Vaikų ligoninės gydytojams.

Dėkoju savo bendražygei Alinai Urnikytei už nepamirštamą laiką ir puikią draugiją darbo rezultatų sklaidos metu.

Dėkoju Mildai Butkutei už pagalbą ir palaikymą visus šiuos metus – už tai, kad bet kada galiu Tau skambinti.

Dėkoju savo tėvams – ten ir čia – už Jūsų meilę, sesers šeimai – už palaikymą.

Ir labiausiai noriu padėkoti savo vyrui: už jo meilę, kantrybę, besąlygišką palaikymą mano kelyje ir buvimą kartu.

## APIE AUTORE

Vardas ir pavardė Birutė Burnytė  
Adresas Medicininės genetikos centras, Santariškių g. 2,  
08661 Vilnius, Lietuva  
Kontaktai Mob. +370 687 39 042  
E. paštas birute.burnyte@santa.lt

### Išsilavinimas

2007 m. Vilniaus universitetas, Medicinos fakultetas,  
medicinos studijų krypties medicinos programa  
(AM Nr. 0630150)  
2012 m. Vilniaus universitetas, Medicinos studijų kryptis,  
gydytojo genetiko kvalifikacija (RZ Nr. 000564)

### Darbo veikla

2010–2012 m. VšĮ VUL SK Medicininės genetikos centras,  
gydytoja asistentė  
2012 m. iki dabar VšĮ VUL SK Medicininės genetikos centras,  
gydytoja genetikė  
2012 m. iki dabar Vaikų ligoninė, VšĮ VUL SK filialas,  
gydytoja genetikė

### Narystė profesinėse organizacijose:

- Lietuvos žmogaus genetikos draugijos narė, generalinė sekretorė
- Europos žmogaus genetikos draugijos narė
- Amerikos žmogaus genetikos draugijos narė
- Paveldimų medžiagų apykaitos ligų specialistų draugijos narė
- Baltijos šalių paveldimų medžiagų apykaitos ligų specialistų draugijos narė
- Europos galaktozemijų registro atstovė Lietuvoje

Kalbos redaktorė *Dalia Blažinskaitė*

Vilniaus universiteto leidykla  
Universiteto g. 1, LT-01513 Vilnius  
El. p. [info@leidykla.vu.lt](mailto:info@leidykla.vu.lt),  
[www.leidykla.vu.lt](http://www.leidykla.vu.lt)  
Tiražas 20 egz.