

34. Filusch A., Giannitsis E., Katus H.A. et al. High-sensitive troponin T: a novel biomarker for prognosis and disease severity in patients with pulmonary arterial hypertension. *Clin. Sci.* 2010; 119: 207–13.
35. Keller T., Zeller T., Ojeda F. et al. Serial changes in highly sensitive troponin I assay and early diagnosis of myocardial infarction. *JAMA.* 2011; 306: 2684–93.
36. Thygesen K., Mair J., Giannitsis E. et al. How to Use High-Sensitivity Cardiac Troponins in Acute Cardiac Care. *Eur. Heart J.* 2012; 33 (18): 2252–7.
37. Mills N.L., Churchhouse A.M., Lee K.K. et al. Implementation of a sensitive troponin I assay and risk of recurrent myocardial infarction and death in patients with suspected acute coronary syndrome. *JAMA.* 2011; 305 (12): 1210–6.
38. Mills N.L., Lee K.K., McAllister D.A. et al. Implications of lowering threshold of plasma troponin concentration in diagnosis of myocardial infarction: cohort study. *Br. Med. J.* 2012; 344: e1533.
39. Thygesen K., Alpert J.S., Jaffe A.S. et al Third Universal Definition of Myocardial Infarction. *Circulation.* 2012; 126 (16): 2020–35.
40. Newby L.K., Jesse R.L., Babb J.D. et al ACCF 2012 expert consensus document on practical clinical considerations in the interpretation of troponin elevations: a report of the American College of Cardiology Foundation task force on Clinical Expert Consensus Documents. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2012; 60 (23): 2427–63.
41. Korley F.K., Jaffe A.S. Preparing the United States for High-Sensitivity Cardiac Troponin Assays. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2013; 61 (17): 1753–8.
42. Filusch A., Giannitsis E., Katus H.A. et al. High-sensitive troponin T: a novel biomarker for prognosis and disease severity in patients with pulmonary arterial hypertension. *Clin. Sci.* 2010; 119: 207–13.
43. Reiter M., Twerenbold R., Reichlin T. et al. Early diagnosis of acute myocardial infarction in the elderly using more sensitive cardiac troponin assays. *Eur. Heart J.* 2011; 32: 1379–89.
44. Mueller M., Biener M., Vafaei M. et al. Absolute and relative kinetic changes of high-sensitivity cardiac troponin T in acute coronary syndrome and in patients with increased troponin in the absence of acute coronary syndrome. *Clin. Chem.* 2012; 58: 209–18.
45. Reichlin T., Irfan A., Twerenbold R., Reiter M. et al. Utility of absolute and relative changes in cardiac troponin concentrations in the early diagnosis of acute myocardial infarction. *Circulation.* 2011; 124: 136–45.
46. Schreiber D.H., Agbo C., Wu A.H. Short-term (90 min) diagnostic performance for acute non-ST segment elevation myocardial infarction and 30-day prognostic evaluation of a novel third-generation high sensitivity troponin I assay. *Clin. Biochem.* 2012; 45 (16–17): 1295–301.
47. Reichlin T., Schindler C., Drexler B. et al. One-hour rule-out and rule-in of acute myocardial infarction using high-sensitivity cardiac troponin T. *Arch. Intern. Med.* 2012; 172 (16): 1211–8.
48. Nagarajan V., Hernandez A.V., Tang W.H. Prognostic value of cardiac troponin in chronic stable heart failure: a systematic review. *Heart.* 2012; 98 (24): 1778–86.
49. Hunt S.A., Abraham W.T., Chin M.H. et al 2009 focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation. *Circulation.* 2009; 119: e391–479.
50. Januzzi J.L. Jr., Filippatos G., Nieminen M. et al Troponin elevation in patients with heart failure: on behalf of the third Universal Definition of Myocardial Infarction Global Task Force: Heart Failure Section. *Eur. Heart J.* 2012; 33 (18): 2265–71.
51. Kanderian A.S., Francis G.S. Cardiac troponins and chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2006; 69: 1112–4.
52. Wang A.Y., Lai K.N. Use of cardiac biomarkers in end-stage renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2008; 19: 1643–52.
53. Khan N.A., Hemmelgarn B.R., Tonelli M. et al. Prognostic value of troponin T and I among asymptomatic patients with end stage renal disease: a meta-analysis. *Circulation.* 2005; 112: 3088.
54. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2013; 3 (Suppl.): 1–150.
55. Wu A.H., Apple F.S., Gibler W.B. et al., National Academy of Clinical Biochemistry Standards of Laboratory Practice: recommendations for the use of cardiac markers in coronary artery diseases. *Clin. Chem.* 1999; 45 (7): 1104–21.
56. Carlton E.W., Gamble J.H., Greaves K. Testing times: we are still some way from getting the best out of sensitive troponin assays. *JAMA Intern. Med.* 2013; 173 (6): 477–9.

Поступила 23.04.13

ГЕМАТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 616.411-006.32-055.5/7-07:577.21.08

К.А. Лукина, И.С. Февралева, Е.П. Сысоева, А.Б. Судариков, Е.А. Лукина

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА БОЛЕЗНИ ГОШЕ I ТИПА

ФГБУ Гематологический научный центр Минздрава РФ, 125167, Москва

Болезнь Гоше – наследственная ферментопатия, в основе которой лежит дефицит активности кислой β-глюкозидазы – лизосомного фермента, участвующего в деградации продуктов клеточного метаболизма.

Целью настоящего исследования явилась характеристика генотипов пациентов с болезнью Гоше I типа в Российской Федерации.

Группу исследования составили 122 взрослых пациента с болезнью Гоше I типа. Методом аллель-специфической полимеразной цепной реакции в реальном времени провели скрининг на выявление четырех наиболее частых мутаций гена кислой β-глюкозидазы (N370S, 84GG, L444P, IVS2+1).

Результаты молекулярно-генетических исследований показали, что у российских больных наиболее часто встречаются мутация N370S и генотип N370S/другая мутация, где второй аллель представлен мутацией, не входящей в число наиболее частых мутаций гена кислой β-глюкозидазы.

Ключевые слова: болезнь Гоше, мутации гена глюкоцереброзидазы, генотип, молекулярно-генетический анализ

K.A. Lukina, I.S. Fevralyeva, E.P. Sysoyeva, A.B. Sudarikov, E.A. Lukina

THE MOLECULAR GENETIC DIAGNOSTIC OF GAUCHER DISEASE TYPE I

The hematological research center of Minzdrav of Russia, 125167 Moscow, Russia

The Gaucher disease is a hereditary enzymopathy underlain by deficiency of activity of acidic β -glycosidase, a lysosomal enzyme participating in degradation of products of cell metabolism. The actual study was carried out to characterize genotypes of patients with Gaucher disease in the Russian Federation. The study group consisted of sampling of 122 adult patients with Gaucher disease type I. The technique of allele-specific polymerase chain reaction in real time was applied to screening for detection of four most frequent mutations of gene of acidic β -glycosidase (N370S, 84GG, L444P, IVS2+1). The results of molecular genetic studies demonstrated that in Russian patients the most frequent is mutation N370S and genotype N370S/other mutation. the second allele is presented by mutation not included into number of most frequent mutations of gene of acidic β -glycosidase.

Key words: Gaucher disease, mutation, gene, glucocerebrosidase, genotype, molecular genetic analysis

Введение. Болезнь Гоше – наиболее частая форма наследственных ферментопатий, объединенных в группу лизосомных болезней накопления. В основе заболевания лежит наследственный дефицит активности кислой β -глюкозидазы (глюкоцереброзидаза – ГЦБ) – лизосомного фермента, участвующего в деградации продуктов клеточного метаболизма [1].

Болезнь Гоше встречается с частотой от 1:40 000 до 1:60 000 у представителей всех этнических групп; в популяции евреев ашкенази частота заболевания достигает 1:450–1:1000. Болезнь наследуется по аутосомно-рецессивному механизму. Ген, кодирующий ГЦБ, локализуется в регионе q21 на 1 хромосоме. Присутствие 2 мутантных аллелей гена ГЦБ (гомозиготное наследование) ассоциируется со снижением (или отсутствием) каталитической активности ГЦБ, что приводит к накоплению в лизосомах макрофагов неутилизованных липидов и образованию характерных клеток накопления (клеток Гоше) – перегруженных липидами макрофагов [2].

Основными клиническими проявлениями болезни Гоше являются спленомегалия, гепатомегалия, цитопения и поражение костей. В редких случаях у детей наблюдаются симптомы поражения ЦНС, что сопряжено с крайне неблагоприятным прогнозом [2]. В соответствии с наличием или отсутствием неврологических проявлений выделяют 3 типа заболевания: I – наиболее частый клинический вариант, без неврологических проявлений; II (острый нейропатический) – встречается у детей раннего возраста, характеризуется тяжелым поражением ЦНС, приводящим к летальному исходу в возрасте до 2 лет; III (хронический нейропатический) – симптомы поражения ЦНС могут проявляться как в раннем, так и подростковом возрасте. Лечение заключается в назначении пожизненной заместительной ферментной терапии (ЗФТ) рекомбинантной глюкозидазы, которая высоко эффективна при I типе, недостаточно эффективна – при III и неэффективна – при II типе болезни Гоше [2].

Стандартом современной диагностики болезни Гоше является биохимическое определение активности ГЦБ в лейкоцитах крови (энзимодиагностика). Диагноз подтверждают при снижении активности фермента менее 30% от нормального значения [2].

Молекулярный анализ для выявления мутаций гена ГЦБ позволяет верифицировать диагноз болезни Гоше, однако в настоящее время не является обязательным и используется для дифференциальной диагностики сложных клинических случаев или для научного анализа [1].

Целью настоящего исследования явилась характеристика генотипов пациентов с болезнью Гоше I типа в Российской Федерации.

Материалы и методы. Группу исследования составили 122 взрослых пациента (48 мужчин и 74 женщины) в возрасте от 18 до 79 лет, медиана возраста 29 лет, с болезнью Гоше I типа. Пациенты находились на обследовании и лечении в

научно-клиническом отделении органических заболеваний ФГБУ Гематологический научный центр Минздрава РФ в период с 2001 по 2012 г.

Диагноз болезни Гоше был подтвержден ферментной диагностикой – определением активности ГЦБ в лейкоцитах периферической крови. Ферментная диагностика осуществлялась в лаборатории наследственных болезней обмена веществ ФГБУ Медико-генетический научный центр РАМН (зав. – доктор мед. наук Е.Ю. Захарова).

Скрининг на выявление четырех наиболее частых мутаций гена ГЦБ (N370S, L444P, 84GG, IVS2+1) осуществляли методом аллель-специфической полимеразной цепной реакции в реальном времени. Исследование проводилось в лаборатории молекулярной гематологии Гематологического научного центра (зав. – доктор биол. наук А.Б. Судариков). ДНК выделяли модифицированным солевым методом: клеточный осадок лизировали раствором, содержащим 100 mM tris-Cl (pH 7,6), 40 mM EDTA (pH 8,0), 50 mM NaCl, 0,2% SDS; насыщенным раствором ацетата аммония осаждали белки, после чего ДНК осаждали равным объемом изопропанола и осадок промывали 70% этиловым спиртом. Рабочая смесь для проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени содержала коммерческий ПЦР-буфер (Syntol Corp. Cat № B009), дополненный 100 pM каждого из 4 дезоксинуклеотидов и 2 mM MgCl₂. Для выявления мутаций N370S, L444P, 84GG, IVS2+1 50 нг ДНК каждого образца добавляли в четыре микропробирки с рабочей смесью, содержащей аллель-специфические праймеры, добавленные в расчете по 5 pM каждого немеченого праймера на пробу. Меченные флюорохромом зонды добавляли по 3 pM на пробу. Праймеры и зонды разработаны А.Б. Судариковым и соавт. (данные не опубликованы). Таq-полимеразу (Syntol Corp. Cat № E039) добавляли из расчета 0,2 ед. на пробу. Объем пробы для ПЦР составлял 25,0 мкл. ПЦР проводили в анализаторе нуклеиновых кислот АНК 32 (Syntol Corp., Russia) в следующем температурно-временном режиме: после предварительного нагрева смеси при 94°C в течение 5 мин проводили 45 циклов амплификации, каждый из которых включал стадию денатурации (15 с при 94°C) и стадию отжига/элонгации (50 с при 64°C).

Результаты и обсуждение. Повреждения гена ГЦБ включают миссенс-мутации, сплайсинговые мутации, вставки, делеции нуклеотидов, кроссоверы между структурным геном и псевдогеном, конверсии генов (негомологичные рекомбинации) [3]. Болезнь Гоше I типа ассоциируется с миссенс-мутациями гена ГЦБ и частичным дефицитом фермента. Напротив, инактивирующие точечные мутации, рекомбинантные аллели и внутригенные делеции сопряжены с накоплением продуктов деградации гликофинголипидов в нервной ткани (нейроны, адвентициальные клетки, микроглия) и развитием нейропатических типов болезни Гоше (II и III).

К настоящему времени описано около 350 различных мутаций гена ГЦБ, из которых 4 (N370S, L444P, 84GG, IVS2+1) встречаются наиболее часто и составляют 90% всех мутантных аллелей гена ГЦБ в популяции евреев аш-

Для корреспонденции:

Лукина Кира Анатольевна, врач-гематолог
Адрес: 125167, Москва, Новый Зыковский пр., 4А
E-mail: kira-1404@gmail.ru

Характеристика генотипов российских пациентов с болезнью Гоше в сравнении с данными Международного регистра болезни Гоше

Генотип	Число больных, % (n = 122)	Данные регистра больных Гоше, % (n = 4093)
N370S/N370S	19	31
N370S/L444P	17	16
N370S/IVS2+1	2	2
N370S/?*	56	25
L444P/?*	2	6
L444P/84GG	1	<1
Другие генотипы	3	19

Примечание. * – любая мутация, кроме N370S, L444P, 84GG и IVS2+1.

кенази и около 60% мутантных аллелей у больных других этнических групп [3, 4].

Наиболее распространенная мутация гена ГЦБ при болезни Гоше I типа N370S, которая вызвана заменой нуклеотида А на G в позиции 1226 комплементарной ДНК. Эта мутация присутствует в 67,2% мутантных аллелей у евреев ашкенази и в 35% у пациентов других национальностей [5]. По данным Международного регистра, наиболее частым генотипом болезни Гоше в мире является генотип N370S/N370S [7].

Результаты молекулярно-генетических исследований, проведенных у российских пациентов с болезнью Гоше, представлены в таблице. Мутацию N370S выявили у 114 (93%) больных, в том числе генотип N370S/N370S у 23 (19%) больных, генотип N370S/L444P у 21 (17%), генотип N370S/IVS2+1 у 2, генотип N370S/другая мутация у 68 (56%) больных.

Миссенс-мутация L444P вызвана заменой нуклеотида Т на С в позиции 1448 комплементарной ДНК. Данная мутация встречается с частотой 3,1% мутантных аллелей в популяции евреев ашкенази и 27,5% аллелей у пациентов других национальностей [5]. По данным Международного регистра, генотип N370S/L444P занимает второе место по частоте встречаемости [6].

В российской группе мутацию L444P выявили у 25 (21%) больных, в том числе генотип N370S/L444P у 21 (17%), L444P/84GG у 1, L444P/другая мутация у 3 больных.

Мутации, приводящие к нарушению синтеза ГЦБ, в гомозиготном и сочетанном гетерозиготном (84GG/IVS2+1) состоянии являются летальными. Мутация 84GG приводит к сдвигу рамки считывания, что препятствует трансляции глюкозидазы, а мутация IVS2+1 (замена G на A в позиции 1067) нарушает сплайсинг первичного транскрипта вследствие удаления из него 2 экзона [7].

IVS2+1 в гетерозиготном состоянии встречается с частотой 3,1% мутантных аллелей в популяции евреев ашкенази и практически не встречается среди пациентов других национальностей [5]. В российской группе мутацию IVS2+1 выявили у 2 больных в гетерозиготном состоянии в сочетании с мутацией N370S.

Мутация 84GG в гетерозиготном состоянии встречается с частотой 12,5% мутантных аллелей в популяции евреев ашкенази и 0,25% у пациентов других национальностей [5]. В нашей группе гетерозиготную мутацию 84GG выявили у 1 больного. У 4 (3%) больных ни одной из исследованных мутаций выявлено не было.

Таким образом, анализ результатов проведенных молекулярно-генетических исследований позволили идентифицировать 2 мутантных аллеля у 47 (39%) больных. У 71 (58%) больного идентифицировали только 1 мутантный аллель. У 4 (3%) больных не обнаружили ни одной из исследованных мутаций гена ГЦБ. Наиболее частой мутацией гена ГЦБ в группе российских пациентов явилась мутация N370S, наиболее распространенным генотипом – N370S/другая мутация.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лукина Е.А. Болезнь Гоше. М.: Литтерра; 2011.
2. Futerman A.H., Zimran A. eds. Gaucher disease. Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC; 2007.
3. Mistry P.K., Cox T.M. The glucocerebrosidase locus in Gaucher's disease: molecular analysis of a lysosomal enzyme. J. Med. Genet. 1993; 30 (11): 889–94.
4. Grabowski G.A. Gaucher disease and other storage disorders. In: Hematology 2012: 54th ASH Annual Meeting and Exposition. Atlanta, Georgia; 2012: 13–8.
5. Mankin H.J., Rosenthal D.I., Xavier R. Gaucher disease. New approaches to an ancient disease. J. Bone Joint Surg. Am. 2001; 83-A (5): 748–62.
6. International Collaborative Gaucher Group Gaucher Registry Annual Report; 2011.
7. Beutler E., Demina A., Gelbart T. Glucocerebrosidase mutations in Gaucher disease. Mol. Med. 1994; 1 (1): 82–92.

REFERENCES

1. Lukina E.A. Gaucher disease. Moscow: Literra; 2011 (in Russian).
2. Futerman A.H., Zimran A. eds. Gaucher disease. Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC; 2007.
3. Mistry P.K., Cox T.M. The glucocerebrosidase locus in Gaucher's disease: molecular analysis of a lysosomal enzyme. J. Med. Genet. 1993; 30 (11): 889–94.
4. Grabowski G.A. Gaucher disease and other storage disorders. In: Hematology 2012: 54th ASH Annual Meeting and Exposition. Atlanta, Georgia; 2012: 13–8.
5. Mankin H.J., Rosenthal D.I., Xavier R. Gaucher disease. New approaches to an ancient disease. J. Bone Joint Surg. Am. 2001; 83-A (5): 748–62.
6. International Collaborative Gaucher Group Gaucher Registry Annual Report; 2011.
7. Beutler E., Demina A., Gelbart T. Glucocerebrosidase mutations in Gaucher disease. Mol. Med. 1994; 1 (1): 82–92.

Поступила 05.03.13