

**Российская академия медицинских наук
ГУ Медико-генетический научный центр**

**На правах рукописи
УДК 616-056.7+577.2.214.622**

Букина Татьяна Михайловна

**Биохимическая и молекулярно-генетическая
характеристика болезни Гоше у российских пациентов**

03.00.15 – Генетика

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва, 2005

Работа выполнена в ГУ Медико-генетическом научном центре РАМН

Научный руководитель – кандидат медицинских наук,
Е.Ю. Воскобоева

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Д.В. Залетаев
Кандидат медицинских наук
А.Н. Прытков

Ведущее учреждение – ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича
РАМН

Защита состоится « 24 » X 2005г.
в _____ часов на заседании Диссертационного совета Д.001.016.01 при ГУ МГНЦ
РАМН по адресу: 115478 г. Москва, ул. Москворечье, д.1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГУ МГНЦ РАМН.

Автореферат разослан « 23 » IX 2005г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
Доктор биологических наук,
Профессор

 Л.Ф. Курило

2004-4

2385492

5591

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

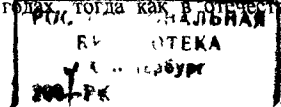
Актуальность темы исследования. Гликофинголипидозы - группа наследственных болезней обмена веществ, характеризующихся нарушением ферментативного гидролиза гликофинголипидов (ГСЛ), важнейших структурных элементов клеточных мембран. Нарушение гидролиза ГСЛ сопровождается их внутрилизосомным накоплением в клетках-мишенях, что приводит к гибели этих клеток.

К гликофинголипидозам относится и болезнь Гоше (БГ). Это аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное мутациями в структурном гене β -D-глюкоцеребозидазы, фермента, участвующего в процессе расщепления ГСЛ и присутствующего в лизосомах всех типов тканей (Brady et al, 1965a). БГ является наиболее распространенным гликофинголипидозом человека, однако три ее основных клинических фенотипа (I - III) распространены с различной частотой. Самым частым из них является тип I, не неврологический, (в различных популяциях от 1:40 000 до 1:60 000 новорожденных), типы II и III, неврологические, встречаются реже (1:100 000 и 1:50 000 соответственно).

Характерными особенностями БГ являются генетическая гетерогенность и клинический полиморфизм (Beutler and Grabowski, 1995), что существенно затрудняет клиническую диагностику БГ. Поэтому для верификации диагноза необходимо проведение биохимических исследований (локусная дифференциация БГ) и молекулярно-генетических исследований (аллельная дифференциация БГ). Использование таких диагностических процедур, очевидно, позволяет решать проблемы точной постнатальной диагностики, а в последствии и пренатальной диагностики БГ, что необходимо для профилактики БГ в семьях высокого риска. Ранняя диагностика, лечение и профилактика БГ, как и других наследственных болезней обмена веществ, имеют большое значение для практики отечественного здравоохранения.

Метод измерения активности кислой β -D-глюкозидазы в клетках крови и фибробластах человека был разработан в 1965г (Brady et al, 1965b). Метод является простым, удобным и быстрым, а также не требует тяжелых инвазивных вмешательств. В 1994г. было обнаружено, что у больных с БГ макрофаги при накоплении негидролизованного субстрата начинают интенсивно синтезировать фермент хитотриозидазу (ХТ), в результате чего активность этого фермента возрастает более чем в сто раз (Hollak et al, 1994). Это позволяет использовать значение активности ХТ в качестве дополнительного маркера в диагностике БГ.

Расшифровка последовательности гена β -D-глюкоцеребозидазы, картированного на хромосоме 1q 21, позволяет проводить анализ спектра мутаций при БГ (Sorge et al, 1985). Молекулярно-генетический анализ БГ начался в 90-х годах, тогда как в отечественной



медицинской генетике еще не проводился (Beutler et al, 1990; Zimran et al, 1991; Sibille et al, 1993).

Практическая значимость выполненной работы определяется задачами медико-генетического консультирования (МГК), т.е. точной диагностикой и дифференциацией различных по тяжести форм заболевания. Для значительного количества семей поводом для обращения в МГК является прогноз жизни ребенка. Тяжесть заболевания влияет на решение родителей о сохранении или прерывании беременности.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы являлись локусная дифференциация БГ и аллельная дифференциация различных клинических форм БГ. В ходе исследования решали следующие задачи:

- формирование выборки больных с болезнью Гоше;
- сравнительный анализ активности дефектного фермента (β -D-глюкоцереброзидазы) у пациентов с различными клиническими формами БГ, носителей БГ и в контрольной группе;
- сравнительный анализ активности маркерного фермента (хитотриозидазы) у пациентов с различными клиническими формами БГ, носителей БГ и в контрольной группе;
- скрининг на частые мутации и поиск редких мутаций в гене БДГ;
- анализ гено-фенотипических корреляций на исследуемой выборке больных.

Научная новизна работы.

- Разработаны подходы к анализу первичной структуры нормального и мутантных аллелей гена β -D-глюкозидазы, позволяющие выявить молекулярные дефекты, лежащие в основе болезни Гоше.
- Впервые был проведен анализ мутантного гена у 55 российских больных с I, II и III типами БГ. Это позволило создать базу для прямого исследования генетической гетерогенности БГ. Разработанные методы исследования позволили идентифицировать 16 мутантных аллелей. В ходе исследования обнаружены три преобладающих мутаций в 9 и 10 экзонах гена β -D-глюкозидазы. Эти результаты позволяют предположить наличие специфических генотипов для российских популяций.
- Впервые определен спектр мутаций в гене β -D-глюкозидазы в выборке российских больных, и предпринята попытка выявления влияния данных мутаций на клиническое проявление БГ.

Практическая значимость работы.

- Отработанный метод биохимической диагностики, основанный на измерении активности β -D-глюкозидазы в лейкоцитах крови, дает возможность достоверно диагностировать БГ без применения сложного и болезненного для пациента исследования пункции костного мозга.

- Дополнительное исследование активности ХТ в плазме дает возможность контролировать правильность постановки диагноза в случаях пограничной активности β -D-глюкозидазы, а также процесс лечения БГ.
- Определение спектра мутаций, характерных для различных клинических форм БГ, создает предпосылки для проведения системного молекулярно-генетического анализа с целью дальнейшего предсказания клинического течения БГ, что является важным для отягощенных семей, а также может использоваться в практике медико-генетических консультаций.

Положения, выносимые на защиту.

1. Проанализированы значения активности β -D-глюкозидазы в выборке пациентов с различными клиническими формами БГ, носителей БГ и в контрольной группе.
2. Проанализированы значения активности хитотриозидазы в выборке пациентов с БГ клиническими формами БГ, носителей БГ и в контрольной группе.
3. Обнаружено 16 мутаций в гене β -D-глюкозидазы у больных с различными клиническими формами БГ, в том числе 7 новых.
4. Выявлены особенности гено-фенотипических корреляций при БГ.

Публикации. По основным положениям диссертации опубликовано 16 научных работ.

Апробация работы. Результаты исследования были представлены на Рабочем совещании «Лизосомные болезни, модели, терапия», Новосибирск 2000; 2 (4) съезде медицинских генетиков, Курск, 2000; 5th European working group on Gaucher disease (EWGGD), Прага, Чехия, 2002г; 6th European working group on Gaucher disease (EWGGD), Барселона, Испания, 2004г; 3 (5) съезд медицинских генетиков, Уфа, 2005.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 114 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты собственных исследований, обсуждение результатов, заключение, выводы, приложения, список литературы. Диссертация содержит 28 таблиц и 32 рисунка. Библиографический указатель содержит 195 источников, из них 190 зарубежных

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

Материалы и методы исследований.

Характеристика выборки больных. Нами было обследовано 152 больных из разных регионов страны с направляющим диагнозом БГ с манифестацией диагноза от 8 месяцев до 62 лет. Клиническое и параклиническое обследование пациентов проводилось на приеме НКО МГНЦ РАМН врачами-генетиками, а также врачами эндокринологического и гематологического отделений Республиканской детской клинической больницы (РДКБ), гематологического отделения Научного центра здоровья детей РАМН (НЦЗД РАМН), НИИ

гематологического отделения Научного центра здоровья детей РАМН (НЦЗД РАМН), НИИ детской гематологии, педиатрического отделения ДКБ № 38, Центральной клинической больницы № 2 МПС, Гематологического научного центра РАМН, Московского областного научно-исследовательского клинического института (МОНКИ) и региональных больниц.

А. Постнатальная энзимодиагностика.

Материал для исследования. Материалом для биохимических исследований являлись лейкоциты и плазма периферической крови пациентов и здоровых доноров разного возраста.

Измерение активности кислой β -D-глюкозидазы. Активность кислой β -D-глюкозидазы измеряли в гомогенате лейкоцитов по стандартной методике (Beutler & Kuhl, 1970).

Измерение активности хитотриозидазы в плазме. Активность хитотриозидазы измеряли в плазме пациентов, разведенной в 50 раз водой, и образцах контрольной плазмы здоровых доноров, использованной без разведения, по стандартной методике (Guo et al, 1995).

Б. Пренатальная энзимодиагностика.

Материал для исследования.

Материалом для исследования служил гомогенат ворсин хориона (ВХ), полученных на 9-10 неделе беременности от женщин из группы высокого риска и от женщин контрольной группы (медицинские абортусы). Биопсию хориона получали из Московского городского центра пренатальной диагностики, родильный дом № 27 (врач Юдина Е.В.).

Измерение активности кислой β -D-глюкозидазы в ВХ.

Активность кислой β -D-глюкозидазы измеряли так же как в гомогенате лейкоцитов, но концентрация субстрата составляла 25мМ.

Молекулярно-генетические методы исследования.

Для молекулярно-генетических исследований использовали ДНК, выделенную из клеток периферической крови.

Поскольку многие мутации гена β -D-глюкозидазы (БДГ) входят в состав нормальной последовательности псевдогена, на 97% гомологичного функциональному гену, то на первом этапе синтезировали участки ДНК, комплиментарные только функциональному гену (Stone et al, 2000). ПЦР-продукты использовали в качестве матрицы для дальнейшей работы.

Для всех образцов, используя стандартные методы ПЦР-анализа и последующего рестрикционного анализа, был проведен скрининг на частые мутации 84_85insG, IVS2⁺1G→A, N370S, D409H, L444P, R463C, и g6765-6819del.

Для обнаружения редких мутаций в гене БДГ исследовали экзоны и области интрон-экзонных соединений гена с использованием метода SSCP-анализа (Condie et al, 1993) и последующего прямого нерадиоактивного секвенирования.

Результаты проведенных исследований и обсуждение.

Характеристика выборки обследованных больных. Из 152 пациентов с направляющим диагнозом БГ биохимическими методами, включавшими измерение активности β -глюкоцеребозидазы лейкоцитов и активности хитотриозидазы плазмы, диагноз БГ был подтвержден у 86. ДНК-анализ был проведен у 55 пациентов из 52 семей, имеющих одного или несколько больных с БГ. На основании клинической картины у 49 пациентов из 55 был определен I тип БГ (неневрологический), у 6 пациентов – II и III типы. Клинический фенотип у пациентов с I тип БГ варьировал: у 2 пациентов была выделена легкая форма тяжести заболевания, у 47 – промежуточная. Пациентов со II и III типами БГ имели тяжелую форму течения заболевания. Для легкой формы были характерны более поздний возраст манифестации заболевания (на 3-5 десятилетии), умеренная спленомегалия, нормальная или близкая к норме формула крови. Для пациентов со средней тяжестью заболевания было характерно появление первых клинических признаков на 1-2 десятилетия жизни, гепатоспленомегалия, гематологические нарушения, анемия различной степени тяжести, частые носовые кровотечения, изменения костной ткани, отставание в физическом развитии. Для тяжелой формы была характерна ранняя манифестация (на 1-2 году жизни), массивная гепатоспленомегалия часто с явлениями гиперспленизма, тяжелая анемия, тромбоцитопения, лейкопения, гипотрофия, тяжелые нарушения скелета, задержка или регрессия психомоторного развития.

Постнатальная энзимодиагностика.

Активность β -D-глюкоцеребозидазы.

Активность β -D-глюкозидазы была измерена в лейкоцитах 152 пациентов с направляющим диагнозом БГ, гетерозигот (родителей пациентов) и контрольной группы. Только у 86 пациентов на основании сниженной активности фермента (0 - 4,2 нМ/мг/ч) диагноз был подтвержден. Средние значения активности β -D-глюкозидазы рассчитанные для этих трех групп приведены в таблице 1, и они не противоречат литературным данным (Galjaard, 1980).

Таблица 1. Активность кислой β -D-глюкозидазы в лейкоцитах.

Обследованная группа	Активность (M $\pm$ SD) (нМ/мг/ч)	Интервал значений (нМ/мг/ч)	Активность (M $\pm$ SD) (нМ/мг/ч) (no Galjaard, 1980)
Контроль (n=219)	10,8 $\pm$ 6,3	2,4 - 52,7	8,2 $\pm$ 3,1
Гетерозиготы (n=50)	6,8 $\pm$ 2,7	2,8 - 12,9	-
Пациенты (n=86)	1,9 $\pm$ 0,9	0 - 4,2	0,3 - 3

Оценка статистической значимости отличий распределения активности β -D-глюкозидазы между группами контроля и гетерозигот, контроля и пациентов и гетерозигот и пациентов с использованием непараметрического критерия Уилкоксона для двух независимых выборок показала их достоверное отличие друг от друга (табл. 2). Оценку

Таблица 2. Оценка значимости средних значений активности β -D-глюкозидазы с использованием критерия Уилкоксона.

Обследованная группа	Контроль (p)	Гетерозиготы (p)	Пациенты (p)
Контроль	-	0,000	0,000
Гетерозиготы	0,000	-	0,000
Пациенты	0,000	0,000	-

статистической значимости отличий распределения активности β -D-глюкозидазы между исследуемыми группами проводили с использованием непараметрического критерия Уилкоксона, так как анализ распределения значений активности фермента в исследуемых группах и проверка согласия эмпирического распределения с теоретическим нормальным законом, проведенный с помощью критерия согласия Колмогорова – Смирнова для сложной гипотезы (Тюрин, Макаров, 1998), показал нормальное распределение значений активности фермента в группе гетерозигот ($p=0,35$) и отличное от нормального распределения в контрольной группе ($p=0,01$) и в группе пациентов с БГ ($p=0,00$).

Активность хитотриозидазы (ХТ).

В качестве дополнительного маркера БГ с 1997г. в плазме всех пациентов, измеряется активность ХТ. У пациентов с БГ наблюдается возрастание активности этого фермента в 100 и более раз.

Сравнение активности ХТ в контрольной группе, группе гетерозигот и группе пациентов с БГ, приведенные в таблице 3, показывают, что у пациентов с БГ активность

Таблица 3. Активность ХТ плазмы при БГ.

Обследованная группа	Активность (M $\pm$ SD) (нМ/мл/ч)	Интервал значений (нМ/мл/ч)	Интервал значений (по Yu. Guo et al, 1995)
Контроль (n=760)	20,5 $\pm$ 1,3	0,0 - 200,0	5-199,4
Гетерозиготы (n=50)	23,1 $\pm$ 5,5	0,0 - 94,0	-
Пациенты (n=85)	11328 $\pm$ 1850,5	1175 - 35550	5580-51800

ХТ была повышена во всех случаях, кроме одного (0,3 нМ/мл/ч). Оценка статистической значимости отличий распределения значений активности ХТ между группами контроля, гетерозигот и пациентов, проведенная с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни (табл. 4), подтвердила существование статистически значимых отличий между группами контроля и пациентов с БГ и между группами гетерозигот БГ и пациентов с БГ и отсутствие статистически значимого отличия активности ХТ между группами контроля и

Таблица 4. Результаты оценки статистической значимости различий показателей активности ХТ при БГ.

Среднее значение активности ХТ		Статистика Манна-Уитни (U)	Уровень значимости (p)
Пациенты 11328,4±1850,5	Контроль 20,5±1,3	701,5	0,00
Пациенты 11328,4±1850,5	Гетерозиготы 23,1±5,5	53,5	0,00
Контроль 20,5±1,3	Гетерозиготы 23,1±5,5	1814,2	0,35

гетерозигот. Для оценки статистической значимости отличий распределения значений активности ХТ использовали непараметрический критерий Манна-Уитни, потому, что анализ распределения значений активности ХТ, проведенный с помощью критерия Колмогорова-Смирнова для сложной гипотезы (Тюрин, Макаров, 1998), и проверка согласия эмпирического распределения с нормальным теоретическим законом, показали, что в обследованных группах распределение было отличным от нормального: пациенты ($p=0,010$), гетерозиготы ($p=0,001$), контроль ($p=0,009$).

В нескольких случаях была отмечена аномально низкая активность ХТ - от 0 до 4,5 нМ/мл/ч. Такие низкие значения ХТ встретились во всех обследованных группах. В гене ХТ описана единственная мутация (дупликация 24 пп в 10 экзоне гена ХТ), наличие которой приводит к полной утрате активности ХТ (Boot et al, 1998). Гетерозиготное носительство этой мутации, вероятно, также изменяет значение активности фермента, поэтому было проведено молекулярно-генетическое исследование на наличие 24-нуклеотидной дупликации в 10 экзоне гена ХТ.

В обследованной выборке пациентов с БГ ($n=55$) было выявлено 13 гетерозиготных носителей этой дупликации (23,6%), а у одного пациента она обнаружена в гомозиготном состоянии (1,8%). У 41 эта дупликация отсутствовала (74,6%). Среди 166 здоровых индивидов, чья ДНК была доступна для исследования, четверо (2,4%) оказались гомозиготными носителями 24нп дупликации, 56 (33,7%) – гетерозиготными носителями дупликации, у 106 (63,8%) дупликация 24нп в гене ХТ отсутствовала.

Оценка статистической значимости отличия распределений активности ХТ у здоровых индивидов при наличии и отсутствии 24-нуклеотидной дупликации в гене ХТ, проведенная с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни, показала статистически значимое отличие в значениях ХТ (табл. 5). Для оценки статистической значимости отличия распределений был использован непараметрический критерий Манна - Уитни, так как анализ распределения значений активности ХТ и проверка согласия эмпирического распределения с теоретическим нормальным законом, рассчитанная с

Таблица 5. Результаты оценки статистической значимости различий показателей активности ХТ у здоровых индивидов.

Среднее значение ХТ		Статистика Манна-Уитни (U)	Уровень значимости (p)
При отсутствии дупликации (n=106)	При наличии дупликации (n=56)		
22,4±4,3	9,1±1,9	886,5	0,00

использованием критерия Колмогорова-Смирнова для сложной гипотезы, показали отличное от нормального распределение в исследуемых группах при гетерозиготном носительстве 24-нуклеотидной дупликации ($p=0,000$) и в ее отсутствии ($p=0,010$). Гомозиготные носители дупликации не анализировались из-за малого количества данных.

Для количественной оценки отличия активностей ХТ при наличии и отсутствии 24-нуклеотидной дупликации в гене ХТ у здоровых индивидов было рассчитано отношение границ доверительных интервалов, которым с вероятностью 0,95 принадлежат средние значения активностей ХТ в рассматриваемых группах (табл. 5):

Активность ХТ при отсутствии дупликации
Активность ХТ при наличии дупликации $\in [1,65; 3,75]$.

Таким образом, было показано, что, во-первых, 24-нуклеотидная дупликация снижает активность ХТ у гетерозиготных носителей и, во-вторых, снижает активность ХТ примерно в 2 раза.

Повторное биохимическое обследование двенадцати пациентов, отобранных для лечения, показало, что значение активности ХТ, полученное при вторичном измерении, было более высоким по сравнению с первоначально измеренным (табл. 6).

Таблица 6. Изменение активности ХТ во времени.

Пациент	Дата первого измерения	Активность ХТ 1	Дата второго измерения	Активность ХТ 2
1.	05.1999	9600	03.2001	27450
2.	06.1999	7025	01.2003	10000
3.	10.1999	7950	01.2000	8850
4.	12.1999	4975	10.2003	12050
5.	01.2000	14250	01.2003	36800
6.	06.2000	13625	01.2001	20750
7.	05.2003	10575	10.2003	13825
8.	11.2003	7550	05.2004	9350
9.	09.2000	4925	09.2003	17600
10.	11.2000	2350	11.2003	4825
11.	06.2002	15400	09.2003	25750
12.	03.2004	9825	04.2004	10100

Для определения характера изменения активности ХТ во времени был применен регрессионный анализ (рис. 1). Для этого исследования была сформирована группа из 20 человек разного возраста, которую составили две наиболее многочисленных группы пациентов с генотипами N370S/L444P и N370S/RecNci I, так как клиническая картина у них сходна. Значения активности ХТ при наличии 24-нуклеотидной дупликации и при ее отсутствии обсчитывались отдельно. Результаты показали, что активность ХТ у пациентов с БГ с возрастом увеличивается, что можно объяснить накоплением негидролизованного субстрата (Hollak et al, 1994).

Результаты регрессионного анализа позволили сделать сравнимыми значения активности ХТ у пациентов разного возраста с одинаковым генотипом. Для чего была введена условная величина «прирост активности ХТ», которая определялась как частное значения активности ХТ и возраста пациента (в годах) в момент биохимической диагностики. У гетерозиготных носителей 24-нуклеотидной дупликации гена ХТ значение прироста активности ХТ умножали на два (перерасчитанные значения прироста активности ХТ приводятся в скобках).

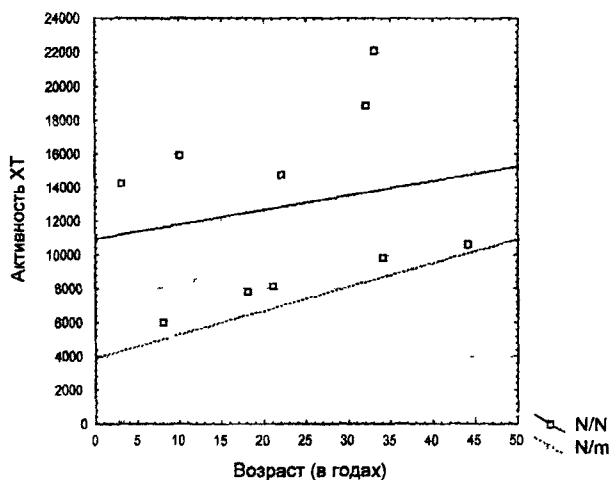


Рис. 1. Изменение активности ХТ у пациентов с генотипами N370S/L444P и N370S/Rec NciI в зависимости от возраста при наличии и отсутствии 24-нуклеотидной дупликации в гене ХТ.

Пренатальная энзимодиагностика.

Дородовая диагностика была проведена в 4 семьях у пяти плодов. Активность β -D-глюкозидазы измеряли в ворсинах хориона на 9-10 неделе беременности. В исследованных

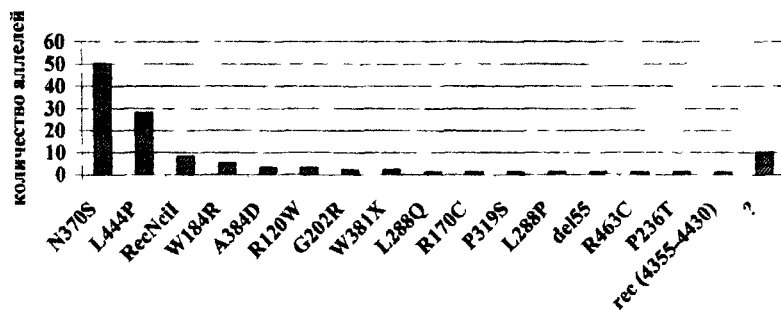
образцах активность фермента колебалась в пределах от 158,7 нМ/мг/ч до 202,8 нМ/мг/ч, что полностью согласовалось с контрольными результатами (норма – 107,8 – 213,9 нМ/мг/ч), поэтому плоды были диагностированы как здоровые. Верификация анализов, проведенная после рождения детей, результаты дородовой диагностики подтвердила.

Молекулярно-генетический анализ БГ.

По данным мировой литературы молекулярно-генетический анализ гена БДГ был начат в 1987г. К началу данного исследования было идентифицировано более 100 мутаций. За последние семь лет обнаружено еще около 50 мутантных аллелей гена БДГ, обуславливающих возникновение различных клинических форм БГ. Молекулярный анализ гена БДГ значительно затруднен из-за наличия псевдогена БДГ (пБДГ) на 97% идентичного функциональному гену, а также из-за возможности образования кроссоверных мутаций между ними.

ДНК-анализ был проведен у 55 из 86 пациентов с подтвержденным диагнозом БГ. Из исследованных 110 аллелей, идентифицировано сто мутаций (рис. 2). При обнаружении обеих мутаций у пациента, исследовалась ДНК его родителей (когда это было возможно).

Рис. 2. Распределение частот мутаций гена БДГ в выборке пациентов с БГ.



ДНК-анализ был начат с исследования восьмого, девятого, десятого и одиннадцатого экзонов гена БДГ, так как в этом регионе располагается наибольшее количество мутаций, в том числе и частые.

На первом этапе исследования для всех пациентов с БГ был проведен скрининг на частые мутации 84_85 insG, IVS2+1G>A, N370S, g6765-6819del (del 55bp), D409H, L444P, R463C и Rec Nci I. В результате массового скрининга были определены восемьдесят мутантных аллелей (72,7%). Самой частой оказалась миссенс мутация N370S (50/110 аллелей БГ) (45,4%) найденная у пяти пациентов в гомозиготном состоянии и у сорока - в гетерозиготном (рис. 3).

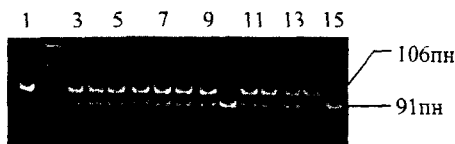


Рис. 3. Скрининг мутации N370S. Гидролиз эндонуклеазой XhoI: 1-N/N (106пн); 2 – маркер длин PUC/MspI (снизу вверх: 67, 110, 111, 147, 190пн); 3-14 - N370S/N (106, 91пн); 15 - N370S/N370S (91пн)

Второй по частоте оказалась миссенс мутация L444P (28/110 аллелей БГ) (25,5%), причем у четырех пациентов она была обнаружена в гомозиготном состоянии, а у двадцати – в гетерозиготном (рис. 4). Поскольку замена L444P может являться частью целого ряда рекомбинантных мутаций, то все амплификационные фрагменты 10 экзона гена БДГ, содержащие мутацию L444P, анализировали методом SSCP (рис. 5). Образцы с аномальной подвижностью секвенировали (рис. 6, 7). Это позволило определить, что только у шестнадцати пациентов из 24 (20/110 аллелей БГ) (18,2%) замена L444P являлась

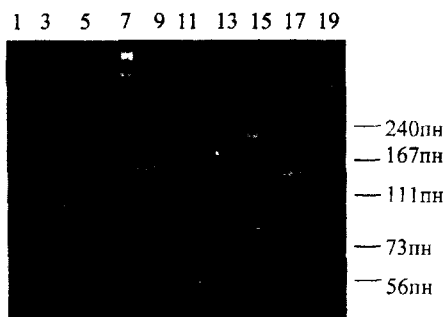


Рис. 4. Скрининг мутаций L444P и H463C. Гидролиз эндонуклеазой Msp I: 3, 8, 11, 16 – N/N (167, 73пн); 2 - 6, 9, 13, 15, 17, 19 – L444P/N (167, 111, 73, 56пн); 1, 10, 18 – L444P/L444P (111, 73, 56пн); 14 –R463C/N (240, 167, 73пн); 12 –L444P/R463C (240, 111, 73, 56пн), 7 – маркер 100пн (снизу вверх 100, 200, 300, 400, 500пн).

самостоятельной мутацией, а у восьми пациентов (8/110 аллелей БГ)(7,3%) она явилась частью рекомбинантной мутации Rec Nci I, где кроме L444P еще присутствует две замены A456P и V460V. Отсутствие мутаций D409H и del 55 в сочетании с L444P позволило исключить наличие других рекомбинантных мутаций. Делеция 55 нуклеотидов в девятом

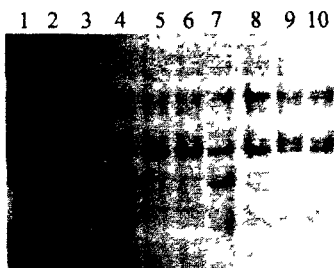
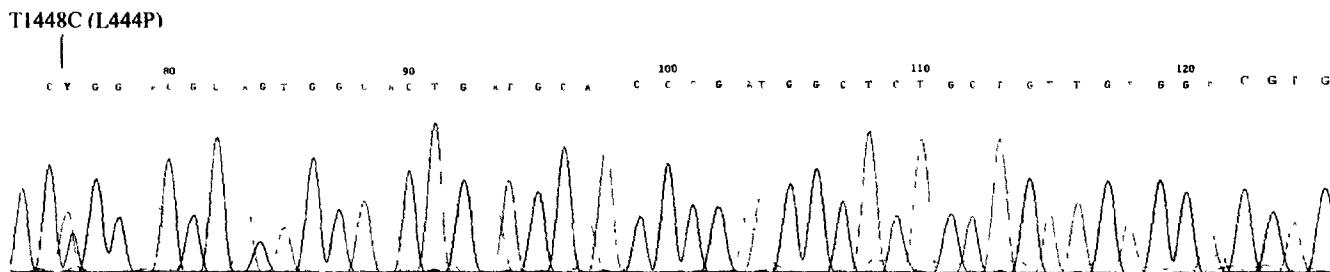
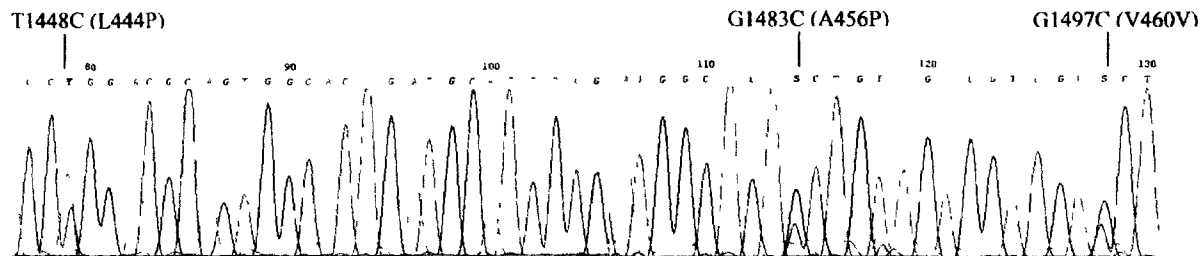


Рис. 5. Результаты SSCP-анализа 10 экзона БДГ: 1, 2, 3, 9, 10 –L444P/N; 4, 7 –RecNciI/N; 5, 6, 8 –N/N.



экзоне гена БДГ была обнаружена у одного пациента в гетерозиготном состоянии (0,9%) как самостоятельная мутация (рис. 8). У одного пациента в гетерозиготном состоянии встретила мутация R463C (0,9%) (рис. 4). Мутации D409H, 84_85 insG и IVS2+1 G>A обнаружены не были.

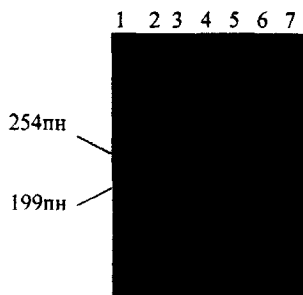


Рис. 8. Делеция 55 нуклеотидов (8% ПААГ) (слева направо): 1 – del 55/N (254, 199пн); 3,4,5,6,7 – N/N (254пн); 2 – маркер длин ДНК Puc/ Msp I (снизу вверх: 110, 111, 147, 190, 242, 331, 404, 489, 501пн)

На втором этапе исследования для поиска редких и новых мутаций использовали метод прямого нерадиоактивного секвенирования. Отбор образцов для секвенирования проводили методом SSCP-анализа (Condie et al, 1993) (рис. 9, 10). Мутации, обнаруженные при секвенировании, подтверждали рестрикционным анализом.

В результате у трех пациентов была обнаружена мутация R120W (2,7%), у четырех пациентов - W184R (3,6%), у двух - G202R (1,8%), у двух - W381X (1,8%) и у трех - A384D (2,7%). Мутации R170C, W184R+rec(g4355-4430), P236T, L288P, L288Q, P319S были встречены только однажды (по 0,9%). Семь мутаций ранее описаны не были (P236T, W184R+rec(g4355-4430), L288P, L288Q, P319S, и A384D, W381X).

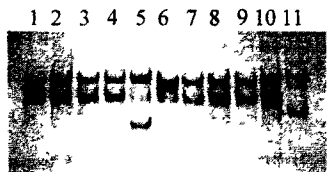


Рис. 9. SSCP-анализ 6 экзона (слева направо). 1-4, 7 - 9 – норма; 5 - G202R/N; 6 - W184R/N; 10 - R170W/N; 11 - W184R +Rec(g4355-4430)/N. Названия мутаций приводятся по результатам секвенса.

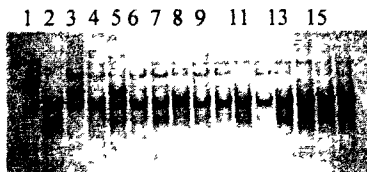
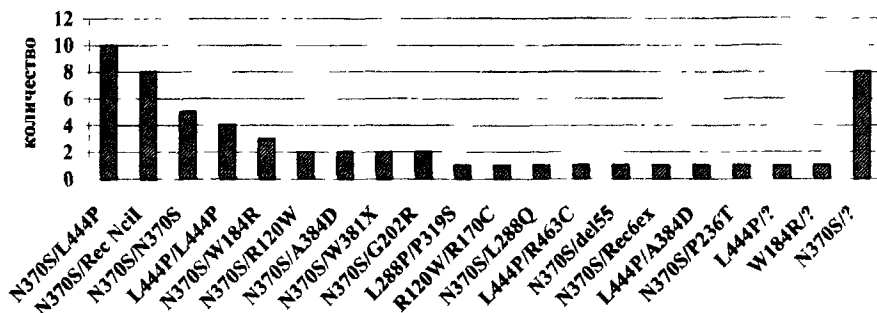


Рис. 10. SSCP-анализ 7 экзона. 1 - 7, 9 - 16 - N/N; 3, 5 - L288P/N; 8 - P236T/N. Названия мутаций приводятся по результатам секвенса.

У пациентов нашей выборки обнаружилась значительная молекулярная гетерогенность (16 различных мутантных аллелей и 17 генотипов) Наиболее частыми генотипами в обследованной популяции были N370S/L444P – 10/55 (18%), N370S/Rec Nci I – 8/55 (15%);

N370S/N370S – 5/55 (9%), L444P/L444P – 4/55 (7%). Остальные 12 генотипов встретились в 1 – 3 случаях (рис. 11).

Рис. 11. Распределение генотипов в популяции пациентов с БГ.



12 из обнаруженных мутаций представляют собой 9 транзий и 3 трансверсии в транскрибируемой области гена БГ, ведущие к аминокислотным заменам, одна из них является нонсенс-мутацией. Одна мутация представляет собой делецию протяженностью 55 пар нуклеотидов в 9 экзоне гена БГ, ведущую к сдвигу рамки считывания и образованию преждевременного кодона терминации в середине 9 экзона. Две мутации образованы по типу рекомбинации между геном и псевдогеном в 6 и 10 экзоне.

Среди семи новых мутаций W381X приводит к образованию стоп-кодона и преждевременной терминации, следовательно, является патогенной. Замены P236T, L288P, L288Q, P319S и A384D можно считать патогенными, поскольку у этих пациентов не было найдено других мутаций ни внутри кодирующего региона, ни внутри интрон/экзонных границ, ни в 5'- или 3'-нетранскрибируемых регионах. В аллеле rec(g4355-4430) 6 экзона содержатся замены W184R, N188K, V191G, S196P, G202R и F213I, соответствующие нормальной последовательности псевдогена. Это предполагает образование данной мутации путем рекомбинации между геном и псевдогеном. Однако у больного СТ41 данный аллель находится в комплексе с N370S, и W184R. Можно предположить, что он образовался в результате кроссинговера между участками мутантного гена и псевдогена. Однако в настоящее время более точное исследование провести невозможно, поскольку ДНК одного из родителей недоступна, а другой является носителем только частой мутации N370S. Описания нескольких пациентов с комплексом мутаций происходящих не из псевдогена приведены в работах Eal et al, 1991; Grace et al, 1999 и Hodanova et al, 1999.

46 пациентов из 55 являются генетическими компаундами по обнаруженным мутациям. У 10 пациентов идентифицирован только один мутантный аллель.

Сравнение полученных данных с данными публикаций по другим популяциям позволяет выявить черты сходства и отличия (табл. 7). Как и в европейских популяциях, в Российской популяции наиболее частыми являются мутации N370S, L444P и recNci I.

Таблица 7. Мутационный профиль популяций пациентов с БГ в разных популяциях (по Coutre et al, 1997; Cormand et al, 1998).

мутации	Россия (n=55)	Чехия (n=29)	Англия (n=46)	Испания (n=35)	Германия (n=21)	Португалия (n=16)	Япония (n=32)
N370S	50/110	28/58	36/92	31/70	17/42	20/32	0
L444P	20/110	11/58	31/92	18/70	8/42	7/32	26/64
Rec Nci I	8/110	5/58	4/92	1/70		2/32	
прочие	32/110	14/58	21/92	20/70	17/42	3/32	38/64

образующими 73,8% мутантных аллелей. Особенности распространения мутаций N370S, L444P и recNci I обуславливают сходство российской популяции с чешской и немецкой. (Hatton et al, 1997; Tylki-Szymanska et al, 1996; Cormand et al, 1995).

К особенностям Российской популяции можно отнести отсутствие мутаций 84_85 insG, IVS2+1 G>A и D409H; обнаружение аллеля R120W у трех не родственных пациентов с заболеванием средней тяжести; ранее не описанного аллеля A384D, у трех не родственных пациентов с тяжелым и средней тяжести течением заболевания и аллеля W184R у пяти пациентов из четырех семей с тяжелым и средней тяжести течением заболевания, причем у одного пациента эта мутация встретилась в комплексе с N370S и rec(g4355-4430).

Исследование популяционного полиморфизма по обнаруженным мутациям.

С целью точной клинической интерпретации ранее не описанных мутаций в гене БДГ был проведен рестрикционный анализ для исключения популяционного полиморфизма по данным нуклеотидным заменам соответствующих амплификационных фрагментов здоровых индивидуумов. При анализе 100 аллелей гена БДГ у 50 контрольных индивидуумов не было выявлено ни одной из мутаций, обнаруженных у пациентов в исследуемой выборке. Это позволяет предположить, что найденные мутации носят повреждающий функцию фермента характер, а не являются проявлениями ДНК-полиморфизма.

Гено-фенотипические корреляции.

Сопоставление результатов биохимической и молекулярно-генетической диагностики с клиническим фенотипом пациентов с БГ показало, что не существует прямой зависимости между клиническими формами тяжести течения БГ и значением остаточной активности β -D-глюкозидазы. Снижение активности кислой β -D-глюкозидазы позволяет только подтвердить диагноз БГ, но не определить ее тип. Так у пациента Л2 с легкой формой БГ I типа значение остаточной активности β -D-глюкозидазы ниже, чем у пациентов Т5 и Т6 с тяжелой неврологической формой БГ (0,7; 2,7 и 2,2 мМ/мг/ч, соответственно) (табл. 8 – 12).

Таблица 8. Активность ХТ и кислой β -D-глюкозидазы у пациентов с БГ.

Пациент, пол, год рожде- ния 1.	Возраст мани- фестации 2.	Актив- ность ХТ (нМ/мл/ч) 3.	Прирост акт-ти ХТ/год 4.	Активность β - D-глюкозидазы (нМ/мг/ч) 5.	Генотип (БДГ) 6.	Дуплика- ция 24пн в гене ХТ 7.
1. Л1 ж, 1947	51	4250	85	2,2	N370S/ N370S	N/N
2. Л2 ж, 1974	29	1275	44 (88)	0,7	N370S/?	N/m

При анализе взаимосвязи прироста активности ХТ (показатель, который мы ввели по результатам регрессионного анализа зависимости активности ХТ от возраста пациентов) и тяжести клинической формы прослеживается корреляция между ними. Прирост активности ХТ менее 100 нМ/мл/ч характерен для БГ тип I с поздней манифестацией (на 3 – 6 десятилетий) и легким течением; от 200 до 1000 нМ/мл/ч – для больных БГ тип I с манифестацией от 2 лет и более тяжелой формой; прирост активности ХТ свыше 1500 нМ/мл/ч – для больных БГ тип III и II (табл. 8 - 12).

Таблица 9. Активность ХТ и кислой β -D-глюкозидазы у пациентов с БГ.

Пациент, пол, год рожде- ния 1.	Возраст мани- фестации 2.	Актив- ность ХТ (нМ/мл/ч) 3.	Прирост акт-ти ХТ/год 4.	Активность β - D-глюкозидазы (нМ/мг/ч) 5.	Генотип (БДГ) 6.	Дуплика- ция 24пн в гене ХТ 7.
3. СТ30 ж, 1977	24	28800	1200	1,9	N370S/ N370S	N/N
4. СТ45 ж, 1980.	4	16000	696 (1392)	3,2		N/m
5. СТ44 м, 1985	4	35550	1975	2,8		N/N
6. СТ31 ж, 1987	6	22400	1600	1,8		N/N

Прослеживается четкая корреляция между генотипом и тяжестью течения БГ – клиническим фенотипом. Генотип N370S/N370S обнаружен только у пациентов с легкой и промежуточной формами БГ I типа. Большинство пациентов с легкой и промежуточной формой тяжести БГ I типа имеют, по крайней мере, 1 аллель представленный N370S. Тяжесть течения БГ у гетерозиготных носителей N370S обусловлена также вторым мутантным аллелем (табл. 8 – 12) У пациентов с генотипом N370S/L444P возраст манифестации варьирует от 2 до 44 лет. Клиническая картина у них сходна и характеризуется гепатоспленомегалией, анемией, панцитопенией, задержкой физического развития и патологией костной ткани различной степени (табл. 10).

Таблица 10. Активность ХТ и кислой β -D-глюкозидазы у пациентов с БГ.

Пациент, пол, год рожде- ния 1.	Возраст мани- фестации 2.	Актив- ность ХТ (нМ/мл/ч) 3.	Прирост акт-ти ХТ/год 4.	Активность β - D-глюкозидазы (нМ/мг/ч) 5.	Генотип (БДГ) 6.	Дуплика- ция 24пн в гене ХТ 7.
7. СТ26 м 1956	44	10650	242	2,5	N370S/ L444P	N/N
8. СТ32 м, 1968	12	22150	671	1,2		N/N
9. СТ36, ж 1970	2	18925	591	2,7		N/N
10. СТ28 м 1979	7	14800	672	1,3		N/N
11. СТ4, ж 1982	21	8175	389	2,6		N/N
12. СТ35 ж 1984	8	7825	435	1,5		N/N
13. СТ10, ж, 1987	7	13175	878	1,2		N/N
14. СТ38 м 1991	9	22150	671	1,2		N/N
15. СТ11, ж, 1990	3	6050	756	1,5		N/N

Пациенты с генотипом N370S/Rec Nci I имели промежуточную форму БГ I типа с возрастом манифестации от 3 до 12 лет. В клинической картине кроме гепатоспленомегалии, анемии, тромбоцитопении, задержки физического развития и различных нарушений костной ткани, характерных для всех пациентов, присоединялись также атопический дерматит, синусовая аритмия, тугоухость, остеомиелитоподобные состояния (табл. 11).

Известно также, что мутация L444P, RecNciI, W184R и G202R в гомозиготном состоянии определяют неврологическую форму БГ (Grace et al, 1997; Choy et al, 2000; Stone et al, 2000). Но у наших пациентов в сочетании с мутацией N370S они образуют генотипы, определяющие БГ I типа с промежуточной формой течения. У пациентов с генотипами N370S/del 55, N370S/L288Q, N370S/W184R, N370S/R120W, N370S/G202R, N370S/A384D, N370S/P236T, N370S/W184R+rec(g4355-4439), N370S/W381X, R120W/R170C, L288Q/P319S, L444P/R463C развилась также БГ I типа с промежуточной формой течения. Для клинической картины этих пациентов характерны гепатоспленомегалия, анемия, тромбоцитопения, связанные с этим частые носовые кровотечения и отставание в физическом развитии.

Наличие мутации L444P как самостоятельной мутации в гомозиготном состоянии обуславливает развитие тяжелой формы БГ II или III типа. Тяжелая неврологическая форма

Таблица 11. Активность ХТ и кислой β -D-глюкозидазы у пациентов с БГ.

Пациент, пол, год рождения 1.	Возраст мани-фестации 2.	Актив-ность ХТ (нМ/мл/ч) 3.	Прирост акт-ти ХТ/год 4.	Активность β -D-глюкозидазы (нМ/мл/ч) 5.	Генотип (БДГ) 6.	Дуплика-ция 24пн в гене ХТ 7.
16. СТ34, м, 1968	6	9900	291	2,8	N370S/ rec Nci I	N/N
17. СТ23 ж 1974	6	5725	220 (440)	2,2		N/m
18. СТ43 ж, 1981	6	15000	714	2,5		N/N
19. СТ47 м, 1991	12	8475	706(1412)	1,3		N/m
20. СТ2, м, 1991	5	7950	994 (1988)	3,0		N/m
21. СТ17, ж, 1993	3	4975	829 (1658)	1,5		N/m
22. СТ21 м 1995	3	0,3	0	3,4		M/m
23. СТ18, ж, 1996	3	14250	4750	2,7		N/N

представлена в нашей выборке шестью пациентами, у четырех из которых мутация L444P обнаружена в гомозиготном состоянии (табл. 12). При БГ II и III типов это наиболее часто встречающаяся мутация (Tsuji et al, 1987).

Таблица 12. Активность ХТ и кислой β -D-глюкозидазы у пациентов с БГ.

Пациент, пол, год рождения 1.	Возраст мани-фестации 2.	Актив-ность ХТ (нМ/мл/ч) 3.	Прирост акт-ти ХТ/год 4.	Активность β -D-глюкозидазы (нМ/мл/ч) 5.	Генотип (БДГ) 6.	Дуплика-ция 24пн в гене ХТ 7.
53. Т6 ж, 1989	2 г.	13950	1550	2,2	L444P/ I.444P	N/N
50. Т1 ж 1998	7мес.	3450	1725	1,9		N/N
51. Т2 м 1999	7мес.	11250	5625 (11250)	1,3		N/m
52. Т5 м, 2002	9мес.	1550	1550	2,7		N/N
54. Т4 м, 2002	5мес.	13675	13675	1,2	L444P/ A384D	N/N
52 Т3 м, 2001	8мес.	15000	15000 (30000)	0	W184R/?	N/m

Еще у одного пациента с тяжелой формой БГ выявлен генотип L444P/A384D. Заболевание у этого пациента проявилось в возрасте 5 месяцев отставанием в развитии, с 9 месяцев – анемия, в 10 месяцев – массивная гепатоспленомегалия, жесткое дыханис,

тахикардия (ЧСС 144/минуту), выраженная потливость, снижение тургора тканей, резкое истончение подкожножирового слоя, в гемограмме тромбоцитопения, лейкопения. Активность ХТ у него превышала 13000 нМ/мл/ч. Основываясь на особенностях фенотипа и биохимической диагностики можно говорить, что мутация A384D является тяжелой и в сочетании с L444P приводит к развитию БГ II типа (табл. 12).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

БГ - наиболее распространенное среди сфинголипидозов заболевание. Оно характеризуется широким спектром клинических форм от мягких бессимптомных до тяжелых с поражением ЦНС. Определение активности β -D-глюкозидазы в лейкоцитах позволяет точно верифицировать диагноз БГ, не прибегая к гистологическим методам исследования. Результаты исследования экспрессии β -D-глюкозидазы показали статистически достоверное снижение активности мутантного фермента в лейкоцитах пациентов с БГ. Столь же важным для диагностики БГ является исследование активности ХТ плазмы, поскольку в некоторых случаях остаточная активность β -D-глюкозидазы настолько высока, что ее значения у пациентов перекрываются со значениями активности у гетерозигот. В этом случае уровень активности ХТ становится дополнительным маркером при верификации диагноза БГ. Ранее было показано, что активность ХТ зависит от количества накопленного субстрата, что позволяет также осуществлять контроль при лечении пациентов с БГ. Результаты проведенного исследования позволяют говорить о взаимосвязи активности ХТ и тяжести клинического фенотипа, а также о взаимосвязи активности ХТ и генотипа.

В результате молекулярно-генетического анализа 55 пациентов было верифицировано 90% мутантных аллелей. Как в большинстве европейских популяций частыми оказались три: N370S, L444P и RecNciI, которые составили 45,6%, 20% и 7,3% от общего числа аллелей, соответственно. В числе редких и единичных мутаций были обнаружены R120W (2,7%), W184R (3,6%), G202R (1,8%), W381X (1,8%), A384D (2,7%), а мутации R170C, P236T, rec(g4355-4430), L288P, L288Q, P319S, R463C и del556 были встречены только однажды (0,9%). 9% мутантных аллелей пока остались не идентифицированными. Отличительной особенностью нашей выборки явилось присутствие четырех аллелей W184R и A384D у неродственных пациентов. У пациентов нашей выборки обнаружилась значительная молекулярная гетерогенность (16 различных мутантных аллелей и 17 генотипов). Сорок шесть пациентов выборки являются генетическими компаундами, а из них сорок два пациента (76,4%) являются гетерозиготными носителями мутации N370S. Наиболее частыми генотипами в обследованной популяции были N370S/L444P – 10/55 (18%), N370S/Rec Nci I – 8/55 (15%); N370S/N370S – 5/55 (9%), L444P/L444P – 4/55 (7%).

Учитывая частоты встречаемости мутаций, а также наличие псевдогена, на 97% гомологичного функциональному гену, и достаточно часто возникающие рекомбинантные мутации, обусловленные кроссинговером между БДГ и пБДГ, можно предложить следующую схему проведения ДНК-анализа для пациентов с БГ:

- скрининг на частые мутации (N370S, L444P, W184R, recNci I, R120W, A384D);
- обязательное исследование родительской ДНК в случае гомозиготного носительства мутации у пробанда;
- если родительская ДНК отсутствует, необходимо проведение дополнительного ДНК-анализа на наличие рекомбинантных мутаций, или крупных делеций гена;

Для практической диагностики основным методом верификации диагноза БГ являются биохимические методы исследования активности β -D-глюкозидазы и ХТ в качестве дополнительного маркера. ДНК-диагностика необходима в случае промежуточного значения активности β -D-глюкозидазы и нулевого значения активности ХТ. ДНК-диагностика на носительство возможна только в семьях с точно установленным генотипом, либо при помощи косвенной ДНК-диагностики. Пренатальная диагностика БГ на ранних сроках беременности также возможна как методом определения активности кислой β -D-глюкозидазы, так и с помощью ДНК-анализа.

ВЫВОДЫ

1. Подтверждена необходимость биохимической диагностики для верификации диагноза БГ вследствие существования значительного количества гено- и фенотипов БГ, т.к. диагноз был подтвержден только у 86 из 152 пациентов с направляющим диагнозом БГ.
2. Проведен сравнительный анализ значений активности кислой β -D-глюкозидазы в контрольной группе, в группах пациентов с различными формами тяжести БГ и в группе облигатных гетерозигот. Получены значения контрольных величин активности β -D-глюкозидазы (контроль – $10,6 \pm 6,3$ нМ/мг/ч; носители – $6,8 \pm 2,7$ нМ/мг/ч; пациенты с БГ – $1,9 \pm 0,9$ нМ/мг/ч. Установлено статистически достоверное снижение активности β -D-глюкозидазы в лейкоцитах пациентов с БГ ($p=0,000$).
3. При сравнительном анализе значений активности ХТ в плазме установлено статистически достоверное возрастание активности фермента у пациентов с БГ ($p=0,00$) и отсутствие достоверного изменения активности ХТ в плазме облигатных гетерозигот по сравнению с нормой ($p=0,35$). Возрастание активности хитотриозидазы ($11328,4 \pm 1850,5$ нМ/мл/ч) является решающим фактом в пользу диагноза БГ при явлении пограничной активности β -D-глюкозидазы между патологией и гетерозиготным носительством.
4. Выявлена корреляция между уровнем прироста активности ХТ и тяжестью течения БГ: прирост активности ХТ менее 100 нМ/мл/ч характерен для БГ тип I с поздней

манифестацией (на 3 – 6 десятилетий) и легким течением; от 200 до 5000 нМ/мл/ч - для больных БГ тип I с манифестацией от 2 лет и более тяжелой формой; прирост активности ХТ свыше 1500 нМ/мл/ч - для больных БГ тип III и II типов с тяжелой неврологической формой заболевания.

5. Впервые в России налажены методы ДНК-анализа гена БДГ. Проведен молекулярно-генетический анализ 55 пациентов. При скрининге на частые мутации было обнаружено три преобладающих аллеля в 9 и 10 экзонах гена БДГ: N370S, L444P и Rec NciI. В процессе исследования идентифицировано 16 мутаций, из которых 7 описаны впервые: P236T, Rec(g4355-4430), L288P, L288Q, P319S, W381X и A384D.
6. Выявлены четкие корреляции тяжести течения БГ с обнаруженными мутациями. Мутация N370S в гомозиготном состоянии обуславливает легкую или промежуточную форму БГ I типа. Клиническое проявление БГ у гетерозиготных носителей N370S обусловлено вторым мутантным аллелем. Наличие мутации L444P в гомозиготном состоянии обуславливает развитие тяжелой клинической формы БГ II или III типов, а в сочетании с мутацией A384D она определяет II тип БГ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. Krasnopol'skaya X.D., Mirenburg T.V., Bukina T.M. Diagnosis and prevention of Gaucher disease in Russia. 2nd EWGGD Workshop. Abstracts, 1997, p. 29.
2. Краснопольская К.Д., Мирепбург Т.В., Ахунов В.С., Покровская А.Я., Шехтер О.В., Захарова Е.Ю., Воскобоева Е.Ю., Букина Т.М. Программа диагностики и профилактики наследственных болезней обмена клеточных органелл у российских больных. "Актуальные проблемы диагностики, лечения и профилактики наследственных заболеваний у детей". Тезисы докладов. 1998, стр. 33-34.
3. Журкова Н.В., Краснопольская К.Д., Кириллова Е.А., Покровская А.Я., Гаркуша В.Е., Дмитриенкова Н.Н., Букина Т.М., Никифорова О.К. Разработка и апробация программы селективного скрининга и методов подтверждения диагноза на наследственные болезни обмена веществ с острым течением и ранним летальным исходом. "Актуальные проблемы диагностики, лечения и профилактики наследственных заболеваний у детей". Тезисы докладов. 1998, стр. 24-25.
4. Краснопольская К.Д., Букина Т.М., Ахунов В.С., Евдокименков В.Н., Захарова Е.Ю., Покровская А.Я., Воскобоева Е.Ю., Шехтер О.В., Типканина С.В., Мытникова Е.А., Погорелов А.Г. Программа диагностики и профилактики наследственных болезней обмена клеточных органелл Вестник РАМН, 1999, №11, стр.16-22.

5. Румянцев А.Г., Смирнова Г.В., Букина Т.М., Лунга И.Н. "Диагностика и лечение наследственных лизосомных болезней накопления у детей. Болезнь Гоше". Проблемы и перспективы" Сборник лекций по актуальным проблемам педиатрии РГМУ, 2000, стр. 599-608.
6. Бейер Е.М., Букина Т.М., Цветкова И.В. "К вопросу диагностики болезни Гоше" Рабочее совещание «Лизосомные болезни, модели, терапия» сборник тезисов, стр. 9, 28-29 сентября, Новосибирск 2000г.
7. Krasnopol'skaya K.D., Boukina T.M. " Diagnoses of Gaucher disease in Russia""Рабочее совещание Лизосомные болезни, модели, терапия" сборник тезисов, стр. 11, 28-29 сентября, Новосибирск 2000г.
8. Букина Т.М., Краснопольская К.Д. "Болезнь Гоше: фенотипические корреляции" 2 (4) съезд медицинских генетиков. Курск, 2000, сборник тезисов стр. 30.
9. Бейер Е.М., Букина Т.М. Цветкова И.В. «Биохимическая и генетическая диагностика болезни Гоше и фенотипическая гетерогенность заболевания» (2000) Вopr. Мед. Химии 46 (5): стр. 451 – 455.
10. Букина Т.М. "Мутации в гене кислой β -D-глюкозидазы у российских пациентов с болезнью Гоше". Вестник РГМУ, 2002, №4 (25), стр. 39-42.
11. Mutations in the gene of the acid β -D-glucocerebrosidase in Russian patients with Gaucher's disease. (стенд The 5th Workshop of EWGGD, 1-4 May, 2002).
12. Boukina T.M. Molecular screening of Russian patients with Gaucher's disease.- Abstract, The 5th Workshop of EWGGD, 1-4 May, 2002, p. 41.
13. Voskoboeva E.Yu., Boukina T.M., Boukina A.M., Zakharova E.Yu., Akhunov V.S. Molecular-genetic analysis of lysosomal storage diseases in Russia. European Journal of Human genetics 2002, p. 208 P0637.
14. T.M. Boukina, E.Yu. Voskoboeva, A.M. Boukina, V.A. Galkina, E.L. Dadali Distribution of genotypes among patients with GD. 6th European working group on Gaucher disease (EWGGD). Barcelona, Spain – October 14 – 16, 2004. P5.
15. Букина Т.М., Басистова А.А., Белогурова М.Б., Гундобина О.С. Болезнь Гоше: патогенез и клинические проявления. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2004, т3, №4, стр. 36-42.
16. Букина Т.М., Воскобоева Е.Ю., Цветкова И.В., Галкина В.А., Дадали Е.Л., Козлова В.М., Руденская Г.Е. Биохимическая и молекулярно-генетическая диагностика болезни Гоше. 3 (5) съезд медицинских генетиков, Уфа, 2005, Мед Генетика, № 4, стр. 162.





Принято к исполнению 21/09/2005
Исполнено 21/09/2005

Заказ № 1060
Тираж: 100 экз.

ООО «11-й ФОРМАТ» ИНН 7726330900
Москва, Варшавское ш., 36
(095) 975-78-56
(095) 747-64-70
www.autoreferat.ru

РНБ Русский фонд

2007-4
5591



29 НОЯ 2005