

К.В. Савостьянов<sup>1</sup>, Н.Н. Мазанова<sup>1</sup>, А.А. Пушков<sup>1</sup>, П.В. Ананьин<sup>1</sup>, А.В. Сухоженко<sup>1</sup>,  
П.В. Смирнов<sup>1</sup>, Н.А. Маянский<sup>1</sup>, А.Н. Цыгин<sup>1</sup>, Л.С. Намазова-Баранова<sup>1,2</sup>

## ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ЦИСТИНОЗА У РОССИЙСКИХ ДЕТЕЙ

<sup>1</sup>ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» МЗ РФ,

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО Российский Национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова  
МЗ РФ, Москва, РФ



Цистиноз является редкой наследственной формой патологии обмена веществ, обусловленной нарушением метаболизма цистина, возникающего вследствие патогенного изменения референсной последовательности нуклеотидов гена *CTNS*. Мутации этого гена приводят к накоплению цистина в лизосомах клеток, оказывая выраженное токсическое действие на ткани всего организма. Целью данной работы являлось выявление спектра и относительных частот патогенных вариантов гена *CTNS*, а также поиск ассоциаций между выявленным генотипом и уровнем цистина, измеренного в крови российских детей, больных цистинозом, с последующей оценкой эффективности проводимой терапии. Для достижения поставленной цели в лаборатории генетики и клеточной биологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» МЗ РФ впервые в России был разработан и внедрен новый способ лабораторной диагностики цистиноза с помощью тандемной масс-спектрометрии, позволяющий проводить раннюю скрининговую диагностику цистиноза и осуществлять контроль за проведением патогенетической субстратредуцирующей терапии посредством измерения концентрации цистина в периферической крови. В результате последующего молекулярно-генетического обследования пациентов с завышенными концентрациями цистина были выявлены новые, не описанные ранее мутации *c.140+2dup*, *c.433C>T*, *c.627C>A*, *c.785G>A*, *c.1000del*, а также мутации, характерные для российских больных. Кроме того, удалось обнаружить статистически достоверную ассоциацию ( $p<0,01$ ,  $OR=45$ ,  $CI$  2,286–885,649) между наличием гомозиготного генотипа, представленного протяженной делецией 57 т.п.н., а также стоп кодоном *c.283G>T*, *c.433C>T*, *c.450G>A* и *c.785G>A* с высокими концентрациями цистина, измеренными до начала патогенетической терапии по сравнению с незначительным превышением концентраций цистина относительно референса у пациентов с другими гомозиготными мутациями гена *CTNS*. Представленные изменения концентрации цистина в крови обследованных больных до лечения и во время лечения демонстрируют современные возможности персонализированной патогенетической терапии цистиноза и указывают на значимость ранней диагностики и раннего начала лечения, а выявленные мажорные мутации позволяют оптимизировать молекулярно-генетическую диагностику цистиноза у российских больных.

**Ключевые слова:** цистиноз, цистин, лизосомные болезни накопления, тандемная масс-спектрометрия, секвенирование, мутации гена *CTNS*.

**Цит.:** К.В. Савостьянов, Н.Н. Мазанова, А.А. Пушков, П.В. Ананьин, А.В. Сухоженко, П.В. Смирнов, Н.А. Маянский, А.Н. Цыгин, Л.С. Намазова-Баранова. Хромато-масс-спектрометрическая и молекулярно-генетическая диагностика цистиноза у российских детей. *Педиатрия*. 2018; 97 (5): 71–78.

### Контактная информация:

Савостьянов Кирилл Викторович – к.б.н., зав. лаб. молекулярной генетики и клеточной биологии ФГАУ «ННПЦЗД» МЗ РФ  
Адрес: Россия, 119991, г. Москва, Ломоносовский пр-кт, 2, стр. 1  
Тел.: (499) 134-14-45,  
E-mail: SavostyanovKV@nczd.ru  
Статья поступила 7.07.17,  
принята к печати 20.06.18.

### Contact Information:

Savostyanov Kirill Viktorovich – Ph.D., head of Laboratory of Genetics and Cell Biology of the National Scientific-Practical Center of Children's Health  
Address: Russia, 119991, Moscow, Lomonosovsky Prospect, 2/ 1  
Tel.: (499) 134-14-45,  
E-mail: SavostyanovKV@nczd.ru  
Received on Jul. 7, 2017,  
submitted for publication on Jun. 20, 2018.

## CHROMATOGRAPHY– MASS SPECTROMETRY AND MOLECULAR GENETIC DIAGNOSIS OF CYSTINOSIS IN RUSSIAN CHILDREN

<sup>1</sup>National Scientific-Practical Center of Children's Health;

<sup>2</sup>Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Cystinosis is a rare hereditary form of metabolic pathology caused by a cysteine metabolism disorder, which results from a pathogenic change in the reference sequence of *CTNS* gene nucleotides. Mutations of this gene lead to the accumulation of cystine in cells, that cause pronounced toxic effect on the tissues of the whole organism. Objective of this research – to identify the spectrum and relative frequencies of *CTNS* gene pathogenic variants and to search for associations between the revealed genotype and the level of cystine measured in the blood of Russian children with cystinosis, followed by an evaluation of therapy efficacy. For this goal, the Laboratory of Genetics and Cell Biology of the National Scientific-Practical Center of Children's Health for the first time in Russia developed and introduced a new method for laboratory diagnosis of cystinosis with the tandem mass spectrometry, which allows early screening of cystinosis and monitoring of pathogenetic substrat reducing therapy measuring the concentration of cystine in peripheral blood. Subsequent molecular-genetic examination of patients with increased cystine concentrations, identified new mutations, not described previously: *c.140+2dup*, *c.433C>T*, *c.627C>A*, *c.785G>A*, *c.1000del*, and mutations, specific for Russian patients. Also a statistically significant association was found ( $p<0,01$ , OR=45, CI 2,286–885,649) between homozygous genotype represented by an extended deletion of 57 kbp, and stop codons *c.283G> T*, *c.433C> T*, *c.450G> A* and *c.785G>A* with high cystine concentrations measured before the pathogenetic therapy, compared with a slight increase of cystine concentrations relative to the reference in patients with other *CTNS* homozygous mutations. The presented changes of cystine concentration in blood of the examined patients before and during treatment demonstrate modern possibilities of personified pathogenetic therapy of cystinosis and indicate the importance of early diagnosis and early treatment, and the identified major mutations allow to optimize the molecular genetic diagnosis of cystinosis in Russian patients.

**Keywords:** cystinosis, cystine, lysosomal accumulation diseases, tandem mass spectrometry, sequencing, *CTNS* gene mutations.

**Quote:** K.W. Savostyanov, N.N. Mazanova, A.A. Pushkov, P.V. Ananyin, A.V. Sukhozhenko, P.V. Smirnov, N.A. Mayansky, A.N. Tsygin, L.S. Namazova-Baranova. Chromatography–mass spectrometry and molecular genetic diagnosis of cystinosis in Russian children. *Pediatrics*. 2018; 97 (5): 71–78.

Цистиноз – редкое наследственное заболевание, причиной развития которого служат мутации гена *CTNS*, кодирующего белок цистинозин – лизосомальный переносчик цистина, и приводящие к накоплению цистина и отложению его кристаллов в лизосомах клеток различных органов и тканей, преимущественно в почках и роговице глаз. Средняя частота болезни колеблется в пределах одного случая на 100 000–200 000 живых новорожденных с представленностью болезни во всех этнических группах в соотношении мужчин и женщин 1,4:1 [1]. При этом даже в рамках одной страны распространенность болезни может сильно варьировать. Так, во французской провинции Бретань цистиноз встречается с частотой 1 случай на 25 909 человек, тогда как на остальной территории Франции – с частотой 1 случай на 326 440 человек [2].

В 1903 г. цистиноз впервые описал швейцарский биохимик Эмиль Абдергальден как

семейную болезнь накопления цистина, ссылаясь на пациента, обнаруженного Эдуардом Кауфманном и умершего в 21-месячном возрасте от почечной недостаточности [3]. Позднее в 1924 г. голландский патологоанатом Джорж Линьяк впервые подробно описал сочетание болезни почек, рахита и задержки роста как клинические проявления цистиноза [4]. Именно поэтому долгое время цистиноз называли синдромом Абдергальдена–Кауфмана–Линьяка, однако позднее вернулись к названию цистиноз, первоначально заявленному Абдергальденом в своем труде. В конце 60-х годов прошлого века ученые смогли отнести цистиноз к группе лизосомных болезней накопления, получив доказательства накопления цистина внутри лизосом [5]. В основе патогенеза цистиноза лежат биаллельные мутации гена *CTNS* протяженностью 23 т.п.н., расположенного в хромосомной области 17p13.2 и кодирующего цистинозин, состоящий

из 367 аминокислотных остатков. Цистинозин экспрессируется на лизосомных мембранах и отвечает за перенос цистина, обусловленный лизосомальным протонным градиентом [6]. Неспособность мутированного цистинозина должным образом осуществлять перенос цистина в цитоплазму приводит к постепенному накоплению цистина внутри лизосом с последующей кристаллизацией ввиду низкой растворимости его молекул в воде. В зависимости от тяжести клинических проявлений и возраста манифестации заболевания различают 3 формы цистиноза: классическая инфантильная нефропатическая форма (OMIM 219800), ювенильная или промежуточная форма (OMIM 219900) и взрослая «доброкачественная» форма (OMIM 219750).

Инфантильная нефропатическая форма наиболее тяжелая и наиболее частая форма цистиноза. На ее долю приходится приблизительно 95% всех случаев болезни и 100% случаев всех обследованных нами пациентов. Она обычно манифестирует в возрасте 6–12 месяцев с полиурии, плохой прибавки в весе, почечного рахита и бессимптомной аминоацидурии, характерной для синдрома Фанкони [7]. В основе его лежит потеря способности проксимальных почечных канальцев реабсорбировать воду, натрий, калий, кальций, магний, фосфаты, бикарбонаты, глюкозу, карнитин и другие вещества ввиду накопления кристаллов цистина с последующей сегментарной атрофией канальцев. Все это приводит к гиперкальциурии, фосфатурии, низкомолекулярной и средномолекулярной протеинурии, аминоацидурии, нормогликемической глюкозурии и гиперхлоремическому ацидозу [8]. В случае отсутствия лечения, либо его позднего начала отмечаются прогрессирующая потеря гломерулярной функции и развитие хронической почечной недостаточности (ХПН) к 7–12 годам [9, 10]. В связи с тяжелой полиурией эпизоды дегидратации, как правило, приближают терминальную стадию почечной недостаточности в раннем возрасте. Наиболее частыми осложнениями цистиноза у пациентов старше 20 лет являются слепота вследствие специфического кератоконъюнктивита, дистальная миопатия, церебральная кальцификация, сахарный диабет и поражения печени, такие как гепатомегалия и узловая дегенеративная гиперплазия. Несмотря на успешно проведенные трансплантации почек, многие пациенты умирают в возрасте до 30 лет [11].

Взрослая не нефропатическая форма цистиноза характеризуется самыми мягкими клиническими проявлениями заболевания, связанными с отложениями кристаллов цистина в роговице глаза, костном мозге и лейкоцитах крови, которые не выявляются в почках [12].

«Золотым» стандартом лабораторной диагностики в настоящее время считается высокоэффективная жидкостная хроматография в комплексе с тандемной масс-спектрометрией

(ВЭЖХ-МС/МС), которая стала широко использоваться для мониторинга лечения этого заболевания, благодаря относительно высокой селективности и чувствительности, позволяя детектировать концентрации цистина вплоть до 0,02 мкмоль/л [13, 14]. Подтверждающим методом диагностики служит молекулярно-генетическая диагностика цистиноза, направленная на поиск мутаций в гене *CTNS*, которых к настоящему времени описано более 120 (<https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/gene.php?gene=CTNS>). Наиболее частой мутацией, выявляемой у больных цистинозом приблизительно в 75% всех описанных в северной Европе случаев, является протяженная делеция, длиной 57257 п.н., частично захватывающая гены *CTNS* и *TRPV1*, а также ген *CARKL* [15, 16]. Пациенты, в геноме которых присутствует эта делеция, характеризуются выраженным экстраренальным фенотипом цистиноза, сопровождаемым ранней смертностью [17]. Помимо этой делеции, были описаны миссенс и нонсенс мутации, мутации сайтов сплайсинга, делеции, инсерции, а также патогенные варианты гена *CTNS*, расположенные в промоторной области и глубоко в интронных областях [18]. Стоит заметить, что работы по выявлению фенотипических корреляций у пациентов с цистинозом проводились рядом зарубежных исследователей в различных популяционных группах [19, 21], однако среди российских пациентов такие работы не проводились. Кроме того, ввиду своей генетической гетерогенности исследование группы российских пациентов с цистинозом представляет особый интерес.

Для дородовой лабораторной диагностики цистиноза используются методы тандемной масс-спектрометрии в сочетании с методами молекулярно-генетической диагностики, причем обе технологии диагностики проводятся как в ворсинах хориона, так и в клетках амниотической жидкости [22].

После расшифровки механизма развития цистиноза начались разработки препарата для лечения болезни, направленные на уменьшение содержания цистина в клетке. Экспериментальный прорыв в связывании и удалении цистина из лизосом удалось совершить благодаря использованию аминокотиола цистеамина, который, вступая в реакцию дисульфидного обмена с цистином, приводит к эквивалентной генерации молекул цистеина-цистеамина и цистеина [23], которые в свою очередь транспортируются из лизосом с помощью собственных транспортеров, минуя путь дефектного цистинозина [24].

Препарат с торговым названием Цистагон (цистеамина битартрат) был одобрен для клинического использования при терапии цистиноза в 1994 г. в США и в 1997 г. в Европе [25]. Цистеамин освобождает клетки от кристаллов цистина более чем на 90%. Терапия

рекомендована всем пациентам с установленным диагнозом независимо от возраста и статуса трансплантации. К сожалению, этот препарат не позволяет остановить прогрессирование синдрома Фанкони, хотя существует одно описание умеренной дисфункции проксимальных канальцев у 2 пациентов, получавших лечение с первых месяцев жизни [26].

Поэтому особую значимость имеют ранняя лабораторная диагностика цистиноза и следующая за ней ранняя субстратредуцирующая терапия. Широкое внедрение хромато-масс-спектрометрической диагностики цистиноза на территории РФ позволит проводить селективный скрининг этой редкой генетической болезни при появлении первых клинических признаков в кратчайшие сроки, а описание популяционных генетических особенностей, свойственных жителям РФ, позволит оптимизировать молекулярно-генетическую диагностику. Кроме того, измерение концентрации цистина в крови пациентов, находящихся на лечении Цистагоном, позволит осуществлять контроль проводимой терапии, внося соответствующие коррективы в случае необходимости.

Целью данной работы являлось выявление спектра и относительных частот патогенных вариантов гена *CTNS*, а также поиск ассоциаций между выявленным генотипом и уровнем цистина, измеренного в крови российских детей, больных цистинозом, с последующей оценкой эффективности проводимой терапии.

### Материалы и методы исследования

С 2012 по 2017 гг. в лабораторию молекулярной генетики и клеточной биологии ФГАУ «ННПЦЗД» МЗ РФ поступили 65 биологических образцов из разных регионов Российской Федерации от пациентов в возрасте от 8 мес до 5 лет с соотношением полов 1,5М:1Ж с подозрением на цистиноз. В качестве биологического материала для проведения исследования была использована цельная венозная кровь пациентов.

Пробоподготовка заключалась в выделении лейкоцитов из образцов крови с последующим лизисом, преципитацией белков с добавлением сульфосалициловой кислоты (SSA) и добавлением внутреннего стандарта, изотопно-меченного дейтерием цистина (цистин-d4).

Хромато-масс-спектрометрический анализ цистина проводили с использованием хроматографа Agilent infinity 1260, производства США и масс-спектрометра высокого разрешения Bruker Maxis Impact, производства Германии.

Хроматографическое разделение проводили с использованием колонки SIELC Primesep 200, 3 мкм, 100x2,1 мм. В качестве элюента была использована смесь ацетонитрила и воды с добавкой муравьиной кислоты. Объемная скорость элюента составляла 200 мкл/мин. Объем инъекции составлял 5 мкл. Классификация чистоты использованных реактивов была для ВЭЖХ-МС. Масс-спектрометрическое детектирование проводили в режиме регистрации

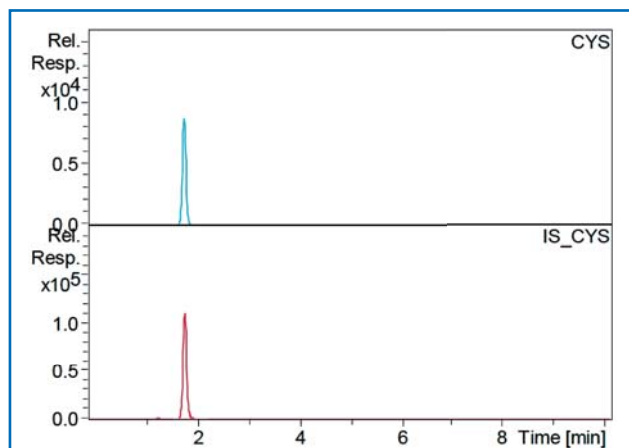


Рис. 1. Хроматограмма рабочего стандартного раствора цистина с концентрацией 0,11 мкмоль/л, которая соответствует нижнему пределу количественного обнаружения методики.

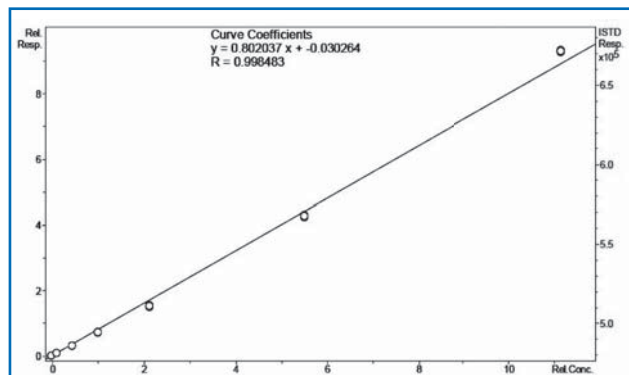


Рис. 2. Калибровочная характеристика аналитической системы.

положительных ионов с использованием электрораспылительной ионизации. Масс-анализатор работал в режиме детектирования ионов в диапазоне 100–500  $m/z$  с точностью определения масс не хуже 5 ppm и разрешении не менее 20 000 (FWHM). Полученные данные обрабатывали с использованием пакета программ Bruker Data Analysis 4.1. Аналитическая система была откалибрована в диапазоне концентраций цистина 0,11–11,1 мкмоль/л. Квадрат коэффициента корреляции калибровочной характеристики составил 0,997. Нижний предел количественного обнаружения цистина составил 0,11 мкмоль/л (рис. 1). Предел детектирования цистина составил 0,01 мкмоль/л.

Для калибровки аналитической системы были проведены измерения 7 рабочих стандартных растворов цистина (рис. 2). Эти растворы различались между собой концентрацией цистина и охватывали диапазон его определяемых концентраций в исследуемых образцах.

Для контроля качества работы методики проводили анализ контрольных образцов с известной концентрацией цистина (рис. 3). Контрольные образцы (ERNDIM) изготавливали искусственным путем с использованием цистина (чистое вещество), белков и других компонентов.

Для проведения молекулярно-генетического исследования гена *CTNS*, кодирующего цистинозин, образцы крови были подвергнуты выделению геномной ДНК с помощью набора реактивов DNeasy



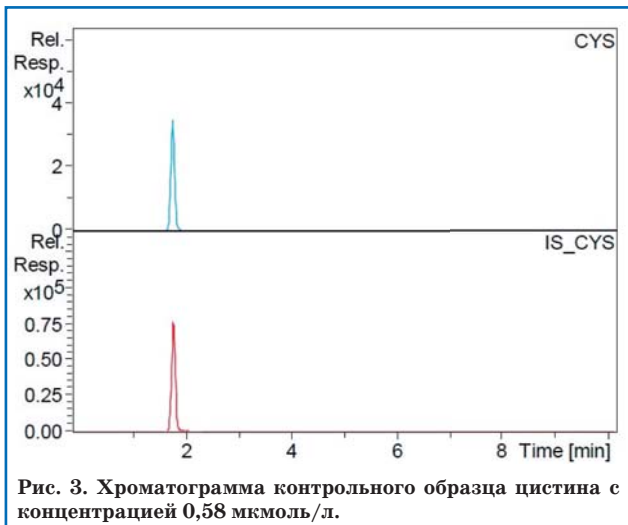


Рис. 3. Хроматограмма контрольного образца цистина с концентрацией 0,58 мкмоль/л.

Blood & Tissue Kit, производства компании QIAGEN (Германия) на автоматической станции QIAcube, производства QIAGEN (Германия). Качество и количество выделенной геномной ДНК было оценено при помощи спектрофотометра NanoVue (GE Healthcare), а также флуориметрически с использованием флуориметра нового поколения Qubit 3.0 (Invitrogen). Последовательности олигонуклеотидов подбирали с помощью программы Beacon Designer 8.10. Проверку специфичности пар праймеров проводили с помощью программы Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Геномную ДНК подвергали амплификации на оборудовании ProFlex™ PCR System, производства компании Thermo Fisher Scientific (США). Продукты амплификации, заключающие в себе все кодирующие и прилегающие интронные области гена *CTNS*, секвенировали при помощи набора реактивов BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, производства компании Thermo Fisher Scientific (США) в соответствии с протоколами и рекомендациями производителя на оборудовании ABI 3500, производства компании Thermo Fisher Scientific (США). Для детекции протяженной делеции 57 т.п.н. использовали метод мультиплексной ПЦР [27]. Для поиска ассоциации между уровнем цистина и мутациями в гене *CTNS* применяли непараметрические методы статистического анализа (Манна-Уитни тест). Для качественного сравнения использовали точный критерий Фишера.

### Результаты

В результате проведенного хромато-масс-спектрометрического исследования 65 биологических образцов крови была выявлена повышенная концентрация цистина у 18 пациентов (27,7%) в диапазоне от 2,4 до 8,98 нмоль ½ цистина/мг белка. Секвенирование кодирующих и прилегающих интронных областей гена *CTNS* у этих пациентов и 4 пациентов с установленным ранее диагнозом позволило выявить 12 различных вариантов гена. При этом 7 вариантов гена (58,3%) были описаны ранее как патогенные, тогда как 5 вариантов (41,7%) не были описаны ранее в международной базе дан-

ных HGMD. Среди описанных ранее вариантов преимущественно выявлялись протяженная делеция 57257 п.н., которая встретила на 11 хромосомах (25%) у 7 пациентов, миссенс мутация *c.1015G>A*, приводящая к замене аминокислотных остатков *p.G339R*, которая встретила на 7 хромосомах (15,9%) у 4 пациентов. Среди вариантов, не описанных ранее, преобладала нуклеотидная замена *c.785G>A*, приводящая к преждевременной терминации трансляции *p.W262X*. Она встретила на 7 хромосомах (15,9%) у 4 пациентов. Именно эти три мутации можно считать мажорными мутациями для всех обследованных российских пациентов (рис. 4).

Среди других неописанных вариантов были выявлены делеция *c.1000del*, приводящая к сдвигу считывания *p.T334Ffs\*6*, дупликация *c.140+2dup*, оказывающая влияние на сплайсинг, нонсенс мутация *c.433C>T*, приводящая к образованию стоп кодона *p.Q145\**, а также миссенс-мутация *c.627C>A*. Интересно отметить, что вариант *c.627C>A* гена *CTNS*, приводящий к замене аминокислотных остатков *p.S209R*, выявленный нами в гомозиготном состоянии и не описанный ранее, соответствовал наименьшему значению цистина, тогда как вариант *c.283G>T*, приводящий к преждевременной терминации трансляции *p.G95\**, соответствовал наибольшему значению цистина, измеренному нами у пациентов до получения субстратредуцирующей терапии (рис. 5).

Повторное измерение концентрации цистина проводили во время патогенетического лечения пациентов препаратом Цистагон. В большинстве случаев показатели цистина были в пределах нормы, либо незначительно превышали ее. Однако у 2 пациентов было обнаружено значительное превышение нормы, что по всей видимости было обусловлено несоблюдением сроков приема препарата.

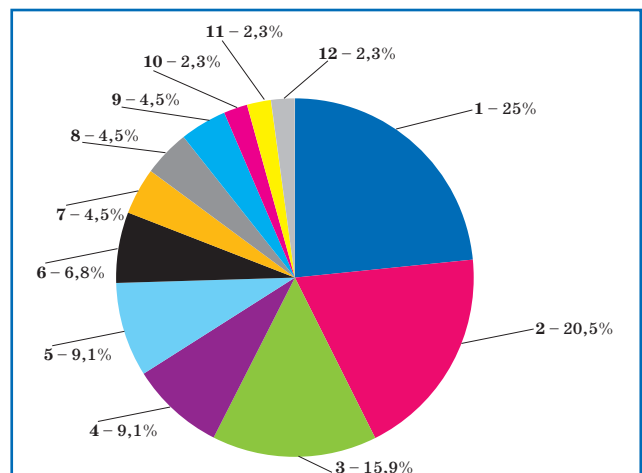


Рис. 4. Спектр и частоты выявленных мутаций в гене *CTNS*.

1 – 57 тпн делеция, 2 – *c.1015G>A*, *p.Gly339Arg*, 3 – *c.785G>A*, *p.W262\**, 4 – *c.283G>T*, *p.Gly95\**, 5 – *c.433C>T*, *p.Gln145\**, 6 – *c.18\_21del*, *p.Thr7Phefs\*7*, 7 – *c.140+2dup*, 8 – *c518A>G*, *p.Tyr173Cys*, 9 – *c.450G>A*, *p.Trp150\**, 10 – *c.627C>A*, *p.S209R*, 11 – *c.681+1G>A*, 12 – *c.1000del*, *p.Thr334Prof\*65*.

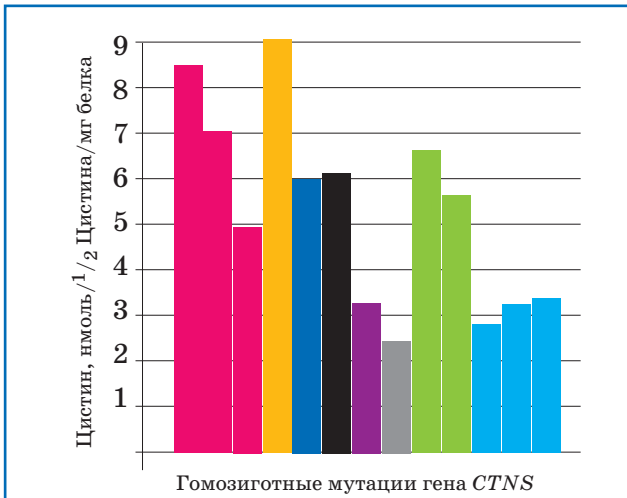
## Клинические и лабораторные показатели обследуемых пациентов

Пол	Возраст	Сус до лечения	Сус во время лечения	Клинические проявления	Нуклеотидная/аминокислотная замена 1/ нуклеотидная/аминокислотная замена 2
		нмоль ½ цистина/ мг белка (норма <2 нмоль ½ цистина/мг белка)			
жен	3 года 9 мес	–	2,08	Задержка физического развития, полный синдром Фанкони, кератопатия. В 8 лет ХБП IV стадия	57 тпн делеция/ 57 тпн делеция
жен	2 года 3 мес	7,82	2,23	Задержка физического развития, анемия, синдром Фанкони, кератопатия, эпизоды гиперазотемии (на фоне обезвоживания?). В 12 лет ХБП IV стадия	57 тпн делеция/ 57 тпн делеция
жен	1 год	6,91	1,91	Нет данных	57 тпн делеция/ 57 тпн делеция
муж	2 года 1 мес	8,41	3,4	Задержка физического развития, синдром Фанкони, кератопатия. В 7 лет 10 мес ХБП IV стадия	57 тпн делеция/ 57 тпн делеция
муж	3 года	7,19	–	Нет данных	57 тпн делеция/с.785 G>A, р.W262*
муж	1 год	4,98	–	Задержка физического развития, полный синдром Фанкони, кератопатия. В 2 года ХБП I стадия	57 тпн делеция/ с.433C>T, р.Q145*
муж	2 года	8,45	–	ХБП V стадия в исходе нефропатического цистиноза. реципиент почечного трансплантата	57 тпн делеция /с.1000del, р.T334Pfs*65
жен	1 год 1 мес	2,74	–	Задержка физического развития, синдром Фанкони, кератопатия. В 1 год 2 мес ХБП II стадия	с.1015G>A, р.G339R/ с.1015G>A р.G339R
жен	9 мес	3,43	1,44	Срыгивания, рвота, задержка физического развития, полный синдром Фанкони. В 4 года ХБП II стадия	с.1015G>A р.G339R/ с.1015G>A р.G339R
жен	1 год 8 мес	3,18	–	Задержка физического развития, неполный синдром Фанкони, кератопатия, анемия. В 6 лет ХБП III стадия	с.1015G>A р.G339R/ с.1015G>A р.G339R
муж	10 мес	5,47	–	Задержка физического развития, полный синдром Фанкони, в 4 года 10 мес кератопатии не выявлено. В 4 года ХБП II стадия	с.1015G>A, р.G339R /с.18_21del, р.T7Ffs*7
муж	4 года 4 мес	–	0,32	ХБП V стадия в исходе нефропатического цистиноза. Реципиент почечного трансплантата	с.18_21del, р.T7Ffs*7/ с.18_21del, р.T7Ffs*7
жен	2 года 2 мес	3,19	–	Полный синдром Фанкони. Летальный исход в 6 лет	с.518A>G, р.Y173C/ с.518A>G, р.Y173C
муж	1 год 7 мес	6,08	2,06	Задержка физического развития, полный синдром Фанкони, кератопатия. Старший брат умер в возрасте 1 года 2 мес (синдром Фанкони). В 7 лет ХБП II стадия	с.450G>A, р.W150*/ с.450G>A, р.W150*
муж	2 года 5 мес	8,98	–	Отставание в физическом развитии, полный синдром Фанкони, рахит, носитель гастростомы. В 4 года ХБП II стадия	с.283G>T, р.G95*/ с.283G>T, р.G95*
жен	4 года 8 мес	–	1,72	Нет данных	с.140+2dup/ с.140+2dup
муж	1 мес	5,94	0,92	Второй ребенок в семье, старшая сестра – реципиент почечного трансплантата (ХБП V стадия в исходе нефропатического цистиноза)	с.433C>T, р.Q145*/ с.433C>T, р.Q145*
муж	4 года 2 мес	–	2,56	Задержка физического развития, синдром Фанкони, кератопатия. В 9 лет ХБП III стадия	с.433C>T, р.Q145*/ с.681+1G>A
муж	6 лет 6 мес	–	–	Задержка физического развития, синдром Фанкони, кератопатия. В 6 лет ХБП IV стадия	с.785G>A, р.W262*/ с.785G>A, р.W262*
муж	8 мес	6,54	0,81	В 7 мес глюкозурия. В 1,5 года ХБП I стадия	с.785G>A р.W262*/ с.785G>A р.W262*
жен	4 года 9 мес	–	–	В 12 лет ХБП V стадия в исходе нефропатического цистиноза. Реципиент почечного трансплантата	с.785 G>A, р.W262*/ с.785 G>A, р.W262*
муж	9 мес	2,4	0,21	Задержка физического развития, синдром Фанкони, почечная недостаточность. ХБП V стадия в 8 лет 9 мес	с.627C>A, р.S209R/ с.627C>A, р.S209R

Прочерки в отдельных графах свидетельствуют об отсутствии соответствующей информации.

С целью выявления ассоциации между концентрациями цистина у больных и различными типами мутаций в гене *CTNS* нами были применены методы непараметрического анализа (Манна–Уитни-тест). Были проанализированы 2 группы больных. В 1-ю группу были вклю-

чены пациенты с гомозиготными мутациями первого класса патогенности (n=10), 2-ю группу составили пациенты с другими гомозиготными мутациями (n=6). Нами было обнаружено, что наличие гомозиготных мутаций, относящихся к первому классу патогенности, было статистиче-



**Рис. 4.** Концентрация цистина, измеренная до получения субстратредуцирующей терапии, у пациентов с гомозиготными мутациями гена *CTNS*.

Столбцы соответствуют концентрации цистина у пациентов с гомозиготными мутациями гена *CTNS*. Каждый из 8 различных патогенных вариантов гена *CTNS* обозначен своим цветом; ■ – 57 т.п.н. делеция, ■ – *c.283G>T, p.Gly95\**, ■ – *c.433C>T, p.Gln145\**, ■ – *c.450G>A, p.Trp150\**, ■ – *c.518A>G, p.Tyr173Cys*, ■ – *c.627C>A, p.S209R*, ■ – *c.785G>A, p.W262\**, ■ – *c.1015G>A, p.Gly339Arg*.

ски достоверно ассоциировано ( $p<0,01$ ,  $OR=45$ ,  $CI\ 2,286-885,649$ ) с более высокими концентрациями цистина.

### Обсуждение

Проведенное нами исследование является первым в России примером селективного скрининга цистиноза с измерением концентраций цистина и описанием относительных частот и спектра выявленных патогенных вариантов гена *CTNS*. Примененный в нашей работе способ хромато-масс-спектрометрического измерения концентрации цистина позволяет получить данные о концентрации цистина у обследуемых пациентов и на основании их анализа принять решение о проведении дальнейшей дорогостоящей молекулярно-генетической диагностики. Такой алгоритм диагностики экономически оправдан и позволяет экономить достаточные временные и материальные ресурсы, позволяя не проводить молекулярно-генетическую диагностику у пациентов с нормальным уровнем цистина. Кроме того, внедрение этапа определения концентрации цистина у больных с подозрением на цистиноз имеет важную научно-практическую значимость и дает возможность найти взаимосвязь между уровнями цистина в периферической крови пациентов и классом патогенности выявленных у них мутаций, что, безусловно, важно для дальнейшего лечения этих больных. Повышенная концентрация цистина и выявленные мутации в гене *CTNS* у 18 пациентов (27,7%) из 65, включенных в скрининговое исследование, свидетельствуют о высокой эффективности предложенного метода диагностики.

Проведенная нами молекулярно-генетическая диагностика показала, что наличие гомо-

зиготных делеций, сдвигающих рамку считывания, нонсенс мутаций, а также мутаций сайтов сплайсинга достоверно ассоциировано ( $p<0,01$ ,  $OR=45$ ,  $CI\ 2,286-885,649$ ) с высокими концентрациями цистина в лейкоцитах крови (рис. 5, см. таблицу), тогда как обладатели других генотипов, в т.ч. и гомозиготных миссенс мутаций, демонстрировали в нашем исследовании менее выраженное увеличение концентрации цистина. Наибольшие значения цистина (свыше 8 нмоль  $\frac{1}{2}$  цистина/мг белка) наблюдались у пациентов с гомозиготной делецией 57 т.п.н., а также нонсенс мутацией *c.283G>T*. Особого внимания заслуживает тот факт, что мутации гена *CTNS* в гомозиготном состоянии встретились в 17 случаях из 22 исследованных родившихся пациентов, составляя более 77% выявленных случаев цистиноза. Мы предполагаем, что такой высокий процент выявленных гомозиготных мутаций может быть отчасти связан с наличием близкородственных браков в семьях пациентов, включенных в исследование. Это подтверждает необходимость включения обязательного медико-генетического консультирования при проведении селективного скрининга на цистиноз, а также при планировании беременности в семьях, отягощенных болезнью.

Около 60% обнаруженных нами мутаций приходится на протяженную делецию, а также на мутации, расположенные в экзонах 10 и 12 гена *CTNS* (см. таблицу), что в целом совпадает с исследованиями, проведенными за рубежом [2, 27], и позволяет рекомендовать начинать молекулярно-генетическую диагностику цистиноза с исследования этих областей гена, что поможет значительно снизить материальные затраты на проведение диагностики.

Измерение концентрации цистина в крови пациентов, получающих субстратредуцирующую терапию, продемонстрировало способность контролировать и в случае необходимости корректировать лечение, предупреждая нежелательные последствия прекращения приема препарата по тем или иным причинам, а также указало на особую эффективность лечения в случае раннего начала приема препарата Цистагон обследованными пациентами.

Примененный в нашей работе пошаговый алгоритм диагностики с использованием хромато-масс-спектрометрического анализа и молекулярно-генетических методов исследования показал высокую эффективность и может быть предложен для внедрения в широкую лабораторную практику для селективной диагностики цистиноза.

### Заключение

Цистиноз относится к группе орфанных заболеваний метаболической природы, требующих комплексного подхода к диагностике. Безусловно, проведение массового скрининга в отношении этой болезни нецелесообразно и уси-



лия должны быть направлены на выделение группы пациентов с соответствующим фенотипом или лиц, имеющих сибсов с уже установленным диагнозом. В нашей работе мы предложили подход, состоящий из двух последовательных этапов: хромато-масс-спектрометрической и молекулярно-генетической диагностики для осуществления селективного скрининга цистиноза в группе российских детей. Выбранный нами подход продемонстрировал высокую эффективность. Полученные результаты свидетельствуют о молекулярно-генетических особенностях российских больных с цистинозом, интересны и новы, с научной точки зрения, и открывают большое поле для дальнейших исследований.

Ранняя диагностика с применением методов, приведенных в работе, и раннее начало комплексной терапии, совмещающей в себе симптоматическую и патогенетическую субстратре-

дуцирующую терапию, а также ее продолжение в течение всей жизни пациента имеют первостепенное значение для обеспечения лучшего контроля над цистинозом, предотвращая существенное замедление роста и задерживая наступление ХПН и других почечных и внепочечных осложнений.

**Финансирование:** авторы статьи подтвердили отсутствие финансовой поддержки исследования, о которой необходимо сообщить.

Savostyanov K.W. [ID](#) 0000-0003-4885-4171

Mazanov N.N. [ID](#) 0000-0002-3473-2897

Pushkov A.A. [ID](#) 0000-0001-6648-2063

Ananyin P.V. [ID](#) 0000-0003-3131-331X

Sukhozhenko A.V. [ID](#) 0000-0003-1152-4929

Smirnov P.V. [ID](#) 0000-0003-0375-0096

Mayansky N.A. [ID](#) 0000-0001-8077-5313

Tsygin A.N. [ID](#) 0000-0001-6301-9313

Namazova-Baranova L.S. [ID](#) 0000-0002-2209-7531

## Литература

1. Nesterova G, Gahl WA. Cystinosis: the evolution of a treatable disease. *Pediatr. Nephrol.* 2013; 28 (1): 51–59.
2. Anikster Y, Sbotelersuk V, Gahl WA. CTNS mutations in patients with cystinosis. *Hum. Mutat.* 1999; 14 (6): 454–458.
3. Abderhalden E. Familiare cystindiathese. *Hopp. Seylers Zetischr. Physiol. Chemie.* 1903; 38: 557–561.
4. Lignac G. Ueber Störung des Cystinost of fwech selb bei Kindern. *Deut. Arch. Klin. Med.* 1924; 145: 139–150.
5. Schulman JD, Bradley KH, Seegmiller JE. Cystine: compartmentalization within lysosomes in cystinotic leukocytes. *Science.* 1969; 166 (3909): 1152–1154.
6. Ruivo R, Belenchi GC, Chen X, Zifarelli G, Sagné C, Debacker C, Pusch M, Supplisson S, Gasnier B. Mechanism of proton/substrate coupling in the heptahelical lysosomal transporter cystinosin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012; 109 (5): 210–217.
7. Лойманн Э, Цыгин А.Н., Саркисян А.А. Детская нефрология. М.: Литерра, 2010: 390.
8. Gaide Chevrionnay HP, Janssens V, Van Der Smissen P, N'Kuli F, Nevo N, Guiot Y, Levchenko E, Marbaix E, Pierreux CE, Cherqui S, Antignac C, Courtoy PJ. Time course of pathogenic and adaptation mechanisms in cystinotic mouse kidneys. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2014; 25 (6): 1256–1269.
9. Middleton R, Bradbury M, Webb N, O'Donoghue D, Van't Hoff W. Cystinosis. A clinicopathological conference. «From toddlers to twenties and beyond» Adult-Paediatric Nephrology Interface Meeting, Manchester. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2003.
10. Brodin Sartorius A, Tete MJ, Niaudet P, Antignac C, Guest G, Ottolenghi C, Charbit M, Moysse D, Legendre C, Lesavre P, Cochat P, Servais A. Cysteamine therapy delays the progression of nephropathic cystinosis in late adolescents and adults. *Kidney Int.* 2012; 81: 179–189.
11. Emma F, Nesterova G, Langman C, Labbé A, Cherqui S, Goodyer P, Janssen MC, Greco M, Topaloglu R, Elenberg E, Dohil R, Trauner D, Antignac C, Cochat P, Kaskel F, Servais A, Wühl E, Niaudet P, Van't Hoff W, Gahl W, Levchenko E. Nephropathic cystinosis: an international consensus document. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2014; 4: 87–94.
12. Anikster Y, Lucero C, Guo J, Huizing M, Shotelersuk V, Bernardini I. Ocular nonnephropathic cystinosis: clinical, biochemical, and molecular correlations. *Pediatr. Res.* 2000; 47: 17–23.
13. Chabli A, Aupetit J, Raehm M, Chadefaux-Vekemans B, Chabli A. Measurement of cysteine in granulocytes using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin. Biochem.* 2007; 40 (9–10): 692–698.
14. Pushkov A, Sukhozhenko A, Savostyanov K, Mayansky N, Tsygin A. Diagnosis of cystinosis in the practice of the Russian medical diversified medical centre. *J. Inher. Metab. Dis.* 2015; 38 (1): 291.
15. Touchman JW, Anikster Y, Dietrich NL. The genomic region encompassing the nephropathic cystinosis gene (CTNS): complete sequencing of a 200-kb segment and discovery of a novel gene within the common cystinosis-causing deletion. *Genome Res.* 2000; 10 (2): 165–173.
16. Kalatzis V, Antignac C. Cystinosis: from gene to disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2002; 17: 1883–1886.
17. Gahl WA, Balog JZ, Kleta R. Nephropathic cystinosis in adults: natural history and effects of oral cysteamine therapy. *Ann. Intern. Med.* 2007; 147 (4): 242–250.
18. Taranta A, Wilmer MJ, van den Heuvel LP, Mannucci L, Wilmer MJ, Luca V, Diomedi-Camassei F, Corallini S, Bellomo F, Heuvel LP, Levchenko EN. Analysis of CTNS gene transcripts in nephropathic cystinosis. *Pediatr. Nephrol.* 2010; 25 (7): 1263–1267.
19. Mohammad Al-Haggar. Cystinosis as a lysosomal storage disease with multiple mutant alleles: Phenotypic-genotypic correlations. *World. J. Nephrol.* 2013; 2 (4): 94–102.
20. Anna Taranta, Martijn J. Wilmer, Lambert P. van den Heuvel, Francesco Emma. Analysis of CTNS gene transcripts in nephropathic cystinosis. *Pediatr. Nephrol.* 2010; 25 (7): 1263–1267.
21. Miguel A. Alcántara-Ortigoza, Astrid B. Martínez-Bernal, Leticia Belmont-Martínez, Marcela Vela-Amieva, Ariadna González-del Angel. CTNS gene analysis emphasizes diagnostic value of eye examination in patients with cystinosis. *J. Pediatr. Genet.* 2013; 2 (3): 129–132.
22. Jackson M, Young E. Prenatal diagnosis of cystinosis by quantitative measurement of cystine in chorionic villi and cultured cells. *Prenat. Diagn.* 2005; 25: 1045–1047.
23. Gahl WA, Tietze F, Butler JD, Schulman JD. Cysteamine depletes cystinotic leucocyte granular fractions of cysteine by the mechanism of disulphide interchange. *Biochem. J.* 1985; 228 (3): 545–550.
24. Pisoni RL, Thoene JG, Lemons RM, Christensen HN. Important differences in cationic amino acid transport by lysosomal system c and system y+ of human fibroblast. *J. Biol. Chem.* 1987; 262 (31): 15011–15018.
25. Elmonem MA, Mahmoud IG, Mehaney DA, Sharaf SA, Hassan SA, Orabi A, Salem F, Girgis MY, El-Badawy A, Abdelwahab M, Salah Z, Soliman NA, Hassan FA, Selim LA. Lysosomal storage disorders in Egyptian children. *Ind. J. Pediatr.* 2016; 83 (8): 805–813.
26. Kleta R, Bernardini I, Ueda M. Long-term follow-up of welltreated nephropathic cystinosis patients. *J. Pediatr.* 2004; 145: 555–560.
27. Forestier L, Jean G, Attard M, Cherqui S, Lewis C, van't Hoff W, Broyer M, Town M, Antignac C. Molecular characterization of CTNS deletions in nephropathic cystinosis: development of a PCR-based detection assay. *Am. J. Hum. Genet.* 1999; 65: 353–359.