

МАЗАНОВА НАТАЛЬЯ НИКОЛАЕВНА

**ОПТИМИЗАЦИЯ АЛГОРИТМА МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ
БОЛЕЗНИ ФАБРИ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

1.5.7. Генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерство здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук,
профессор, академик РАЕН

Асанов Алий Юрьевич

Научный консультант:

Доктор биологических наук

Савостьянов Кирилл Викторович

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры госпитальной педиатрии ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Волгина Светлана Яковлевна

Кандидат медицинских наук, доцент, ведущий научный сотрудник, врач-генетик ГБУЗ «Научно-практический центр специализированной медицинской помощи детям им. В.Ф. Войно-Ясенецкого ДЗМ», доцент кафедры неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики им. Академика Л.О. Бадаляна педиатрического факультета ФГАОУ ВО "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Жилина Светлана Сергеевна

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»

Защита диссертации состоится ____ февраля 2024 года в 15.00 на заседании диссертационного совета ПДС 0300.005 на базе ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6, и на сайте

<https://www.rudn.ru/science/dissovet/dissertacionnye-sovety/pds-0300005>

Автореферат диссертации разослан «___» _____ 2024 года

Ученый секретарь

диссертационного совета ПДС 0300.005
кандидат биологических наук, доцент

Гигани Ольга Олеговна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Болезнь Фабри (БФ) – является редким X-сцепленным наследственным заболеванием нарушения обмена гликофинголипидов, для которого характерно снижение активности лизосомальной α -галактозидазы А (ЕС 3.2.1.22). Дефицит лизосомальной α -галактозидазы А (α -гал А) приводит к прогрессирующему накоплению токсических метаболитов (глоботриаозилцерамида (Гб3) и родственных ему гликофинголипидов, в том числе глоботриаозилсфингозина (лизо-Гб3)) в лизосомах и, как следствие, к нарушениям функционирования большинства жизненно важных систем организма. Полагают, что накопление гликофинголипидов в лизосомах клеток запускает каскад событий, вызывающих гибель клеток, окислительный стресс, ишемию тканей с последующим поражением нервной, сердечно-сосудистой и мочевыводящей систем. Инфаркт миокарда, инсульт головного мозга, а также терминальная стадия хронической почечной недостаточности (ХПН) являются главными причинами сокращения продолжительности жизни пациентов с БФ¹⁻².

Потеря функции фермента обусловлена мутациями кодирующей и не кодирующей последовательностей нуклеотидов гена *GLA*, состоящего из 7 экзонов, расположенного на длинном плече хромосомы 22 в области Xq22 и включающего 12436 пар нуклеотидов. Развитие заболевания обусловлено эффектами патологических мутаций гена *GLA*, в результате чего не только снижается активность α -гал А, но и происходит накопление токсических метаболитов, в связи с чем БФ относят к болезням накопления³.

К настоящему времени описано более 1000 различных мутаций гена *GLA*, вызывающих преждевременную терминацию трансляции, сдвиг рамки считывания, изменение существующих и образование новых сайтов сплайсинга, короткие и протяженные делеции и вставки, а также нарушение структуры экспрессируемого белка вследствие миссенс-мутаций.

В большинстве семей с БФ заболевание обусловлено уникальными редкими мутациями, объясняющими существование клинического полиморфизма БФ и значительное разнообразие диапазона остаточной активности фермента.

Для заболевания характерен различный возраст дебюта и клинический полиморфизм, при этом первые симптомы БФ у мальчиков манифестируют несколько раньше в сравнении с девочками (как правило, в возрасте 3–10 лет).

В настоящее время для лечения БФ разработана и используется заместительная энзимная терапия рекомбинантной человеческой α -галактозидазой А. Успешность энзимотерапии напрямую связана с максимально ранней постановкой диагноза. Однако постановка диагноза и оказание адекватной помощи значительно запаздывают и зачастую проводятся только в виде симптоматической терапии.

¹ Schiffmann R. et al. Fabry disease: Progression of nephropathy, and prevalence of cardiac and cerebrovascular events before enzyme replacement therapy // *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2009. № 7 (24). С. 2102–2111.

² Mehta A. et al. Fabry disease: A review of current management strategies // *QJM*. 2010. Т. 103. № 9. 641–659 с.

³ Groza T., et al. The human phenotype ontology: Semantic Unification of Common and Rare Disease // *Am. J. Hum. Genet.* 2015. Vol. 97, no. 1. Pp. 111-124.

Тогда как постановка диагноза на ранней стадии заболевания и своевременное начало патогенетической терапии позволяют снизить риск возникновения необратимых изменений органов и тканей пациентов, страдающих БФ, и существенно облегчить их состояние.

Вместе с тем широкий клинический полиморфизм, а также значительное число фенокопий в виде известных нозологических состояний существенно затрудняет клиническую диагностику заболевания, а разрабатываемые программы и алгоритмы этой диагностики не всегда реализуемы в условиях любого стационара и требуют мобилизации всего потенциала лечебно-профилактического учреждения для того, чтобы заподозрить БФ. Вышеуказанные моменты являются поводом для продолжения научных исследований с целью поиска адекватных технологий диагностики, с применением методов тандемной масс-спектрометрии и двунаправленного секвенирования для постановки точного лабораторного диагноза с минимальными временными затратами.

Цель и задачи исследования

Целью настоящего исследования является оптимизация алгоритма диагностики классической и атипичной формы болезни Фабри, основанная на оценке диагностической эффективности биохимических и молекулярно-генетических методов верификации диагноза больных из Российской Федерации.

Для достижения цели диссертационного исследования были сформулированы следующие задачи:

1. Получить образцы крови пациентов из групп повышенного риска болезни Фабри и провести селективный скрининг заболевания биохимическими и молекулярно-генетическими методами, определив наиболее частые клинические проявления БФ у выявленных пациентов.
2. Оценить чувствительность и специфичность метода измерения концентрации субстрата лизо-ГБЗ и активности фермента α -гал А для диагностики пациентов с классической формой БФ.
3. Определить спектр и оценить относительные частоты различных вариантов гена *GLA* в выборке российских пациентов с классической и атипичной формой болезни Фабри.
4. Оценить силу взаимосвязи специфичности генотипа с тяжестью клинических вариантов болезни Фабри.
5. Предложить оптимальный алгоритм диагностики классической и атипичной формой болезни Фабри у российских пациентов.

Научная новизна исследования

Впервые осуществлен селективный скрининг классической и атипичной формы БФ в сухих пятнах крови, исследованных у 12256 пациентов, отобранных в соответствии с клиническими проявлениями у пациентов. Комплексный подход к диагностике БФ позволяет повысить эффективность выявления манифестных гетерозиготных пациентов с БФ, которым требуется ФЗТ лечение.

Впервые установлены особенности эпидемиологии и выявления БФ в различных федеральных округах РФ, показана высокая частота семейных случаев, а также несвоевременность

диагностики БФ, связанная с проведением большого числа необоснованных диагностических и лечебных вмешательств.

Впервые в РФ проведено исследование атипичной формы БФ, включающее технологию высокопроизводительного секвенирования. Доказано, что субстрат лизо-Гб3 является биомаркером для первичного скрининга классической формы БФ у пробандов обоих полов из групп повышенного риска. Впервые представлен глоботриаозилсфингозин, как критерий контроля эффективности ферментозаместительной терапии у пациентов с классической формой БФ.

Всего в гене *GLA* идентифицировано 36 различных каузальных вариантов с преобладающей частотой в экзонах 5 (22%), 6 (22%) и 7 (26%). Большую часть выявленных вариантов составляют миссенс мутации 23 (64%), также обнаружено 5 (14%) делеций, 7 (19%) нонсенс-мутаций и 1 (3%) дупликация. У 12 (36%) пациентов были выявлены новые мутации, не описанные ранее в базе данных Human Genome Mutation Database (HGMD), для большинства которых описаны вызываемые ими фенотипические проявления болезни.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработанные алгоритмы комплексной лабораторной диагностики классической и атипичной формы болезни Фабри показали высокую эффективность при проведении селективного скрининга 12256 российских пациентов из групп высокого риска и позволили изучить генотип-фенотипические корреляции заболевания.

Проведенные исследования показали возможность использования лизо-Гб3 в качестве первичного биомаркера для диагностики классической формы БФ у пробандов обоих полов. В ходе работы определены регионы России с наибольшим и наименьшим числом выявленных пациентов с БФ. Охарактеризован спектр и типы каузальных вариантов у российских пациентов с классической и атипичной формой БФ. Выявлены новые патогенные варианты гена *GLA*, ранее не описанные в международной базе HGMD. Выявленные новые 12 каузальных вариантов гена *GLA* пополняют международную базу данных мутаций человеческого генома HGMD, почти на 1%.

По результатам исследования новые научные данные, касающиеся диагностики, лечения и профилактики болезни Фабри, включены в учебный процесс кафедры медицинской генетики федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России) в раздел №3 «Клиническая генетика, характеристика наследственных болезней», основой профессиональной образовательной программы по специальности «Генетика» и раздел №7 «Лабораторные методы диагностики наследственных болезней» основой профессиональной образовательной программы по специальности «Лабораторная генетика»; включены в учебные планы циклов для подготовки ординаторов, циклов профессиональной переподготовки специалистов и циклов повышения квалификации врачей по направлению «Генетика» и «Лабораторная генетика».

Основные результаты, научные работы и практические рекомендации, изложенные в диссертации, внедрены в научно-исследовательскую и практическую деятельность. Оптимизированы протоколы лабораторной диагностики в лаборатории молекулярной генетики и медицинской геномики Центра фундаментальных исследований в педиатрии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Полученные данные используются при оказании медицинской помощи пациентам с подозрением на БФ и применяются при работе Консультативно-диагностического центра федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации). Использование результатов диссертационной работы позволило повысить эффективность диагностики болезни Фабри и послужило основой для развития других методов диагностики лизосомных болезней накопления Центра фундаментальных исследований в педиатрии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Методология и методы исследования

Объектом научного исследования являлись высушенные на фильтровальной бумаге пятна крови, полученные у 12256 российских пациентов. Биологический материал отбирали в соответствии с определенными критериями и направляли на диагностику в лабораторию молекулярной генетики и медицинской геномики Центра фундаментальных исследований в педиатрии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации в рамках селективного скрининга на БФ. Методология проведенного нами исследования основывается на использовании скринингового подхода, который позволяет определять концентрацию лизо-Гб3 и активность α -гал А на первом этапе у пациентов с подозрением на классическую форму БФ. Пациенты, у которых выявлено завышение лизо-Гб3 и/или снижение α -гал А, отбираются в группу риска. Всем пациентам из группы риска проводятся молекулярно-генетические исследования, включающие выделение геномной ДНК, полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и исследование кодирующих и прилегающих интронных областей гена *GLA* методом секвенирования по Сэнгеру. При проведении скрининга на атипичную форму БФ в группе пациентов с ГКМП и подозрением на атипичную форму БФ использовалась технология высокопроизводительного секвенирования в качестве теста первого уровня. Для пациентов с мутациями гена *GLA* описываются клинические, возрастные и геногеографические особенности.

Положения, выносимые на защиту

1. Биомаркеры лизо-Гб3 и α -гал А, обладают достаточной чувствительностью, специфичностью и прогностической значимостью для диагностики классической формы БФ. Преимущество определения концентрации биомаркера лизо-Гб3 в качестве теста первого уровня подтверждено селективным скринингом 10300 пациентов с подозрением на классическую форму БФ.
2. Технологию высокопроизводительного секвенирования целесообразно использовать для диагностики атипичной формы БФ у взрослых пациентов с гипертрофической кардиомиопатией.

3. Относительные частоты и спектр патогенных вариантов гена *GLA*, вызывавших БФ у 36 российских пациентов, выявленных в результате проведения селективного скрининга, не позволяют определить мажорные патогенные варианты, характерные для определенных регионов РФ.

4. Оптимизация алгоритмов диагностики классической и атипичной формы БФ позволит выявлять это редкое генетическое заболевание у российских пациентов с эффективностью, приближающейся к 100%.

Степень достоверности и апробации результатов

Высокая степень достоверности результатов диссертационного исследования подтверждается значительным числом проведенных исследований на репрезентативной выборке российских пациентов с подозрением на болезнь Фабри, выбором дизайна исследования, соответствующего поставленной цели и сформулированным задачам настоящей работы.

Результаты, полученные в работе, основаны на современных высокотехнологичных методах исследования, в числе которых:

Исследование активности фермента α -гал А и концентрации биомаркера лизо-ГБЗ в пятнах крови, нанесенных на фильтровальную бумагу, методом тандемной масс-спектрометрии.

Молекулярно-генетическая диагностика кодирующих и прилегающих интронных областей гена *GLA* методом секвенирования по Сэнгеру, а также методом высокопроизводительного секвенирования.

Сформулированные выводы подкреплены полученными и обчисленными экспериментальными данными, которые наглядно представлены в виде рисунков и таблиц.

Диссертация апробирована на заседании кафедры медицинской генетики Института Клинической Медицины имени Н.В. Склифосовского (ФГАО УВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский Университет)) протокол заседания №1 от 15.09.2022 года.

Основные теоретические положения и результаты диссертационной работы были доложены и обсуждены на российских и международных научно-практических конференциях и семинарах: IV межвузовская междисциплинарная научно-практическая студенческая конференция «Генетика в системе медицинских наук» (Москва 2021 год); 13-м Международном конгрессе врожденных нарушений метаболизма, IСЕМ (Рио-де-Жанейро, Бразилия, 2017); I всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Орфанные болезни: прошлое, настоящее, будущее» (Москва 2022 год).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационное исследование соответствует паспорту специальности 1.5.7. Генетика (медицинские науки), а именно п. 19 – Генетика человека. Медицинская генетика. Наследственные болезни. Медико-генетическое консультирование. Болезни с наследственной предрасположенностью. Генетика старения. Иммуногенетика. Онкогенетика. Генетика поведения. Молекулярно-генетическая/биохимическая диагностика заболеваний человека. Фармакогенетика. Гентоксикология. Генетическая терапия.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в проведении работы на всех ее этапах.

1. Изучение литературы. Автором проанализирована отечественная и зарубежная литература по теме диссертации;
2. Формулирование цели и задач исследования;
3. Работа над экспериментальной частью, получение результатов, формулирование выводов, написание рукописи. Автор принимал участие в планировании эксперимента и лично осуществил практическую и аналитическую часть работы. Автор самостоятельно выполнил этапы биохимического и молекулярно-генетического исследования, провел обработку, анализ и интерпретацию полученных результатов, сформулировал выводы;
4. Подготовка материалов исследования к публикации в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах, представление результатов исследования на конференциях.

Публикации по теме диссертации

По теме и материалам диссертации опубликовано 6 научных работ, в том числе 2 статьи опубликованы в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. 1 печатная работа является материалом Российской конференции и 3 статьи напечатаны в иностранных журналах для соискателей ученой степени кандидата или доктора медицинских наук, входящих в базу данных Scopus и Web of Science.

Структура и объем диссертации

Работа включает введение, обзор литературы, главу собственных исследований, заключение, выводы, список использованной литературы. Диссертация изложена на 135 страницах машинописного текста, проиллюстрирована 20 таблицами, 30 рисунками. Библиографический список литературы состоит из 147 публикаций, из них 134 зарубежных и 13 отечественных источников.

Этическая экспертиза

Исследование было одобрено на заседании Локального этического Комитета ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), протокол № 10-19 от 17.07.2019 г., представитель – Николенко В.Н.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Научные исследования проведены на базе кафедры медицинской генетики Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского (научный руководитель работы – профессор, д.м.н. Асанов А.Ю.) федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) (ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), ректор – академик РАН Глыбочко П.В.) и на базе лаборатории молекулярной генетики и медицинской геномики Центра фундаментальных исследований в педиатрии

(начальник Центра – д.б.н. Савостьянов К.В.) федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, директор – д.м.н., профессор Фисенко А.П.). Представителями пациентов, а также самими пациентами в возрасте старше 14 лет было подписано информированное согласие на обработку персональных данных.

Биологическим материалом для проведения селективного скрининга на БФ, являлись пятна крови, высушенные на фильтровальной бумаге.

Дизайн исследования

Дизайн исследования включал шесть основных этапов (Рисунок 1).

Первый этап. Произведен сбор 12256 биологических образцов, представленных пятнами крови на фильтровальной бумаге, полученных от российских пациентов с подозрением на болезнь Фабри из разных Федеральных округов России. Биологический материал поступал из клиник или отделений лечебно-профилактических медицинских учреждений.

Второй этап. Осуществлялась сортировка биологического материала соответственно сведениям ретроспективного анализа сопровождаемой медицинской документации (выписки из истории болезни, амбулаторных карт). Материал для исследования был разделен на две группы. Первую группу составили 10300 образцов пятен крови пациентов из разных отделений государственных и частных медицинских учреждений, направленных для исключения классической формы БФ. Во вторую группу вошли образцы пятен крови 1956 пациентов из кардиологических отделений с направляющим диагнозом «Гипертрофическая кардиомиопатия» (ГКМП) с подозрением атипичной формы БФ для проведения молекулярно-генетических исследований методом высокопроизводительного секвенирования (ВПС) для выявления атипичной формы болезни Фабри.

Третий этап. В соответствии с задачами исследования для образцов крови двух сформированных выборок проведены различные лабораторные исследования:

в образцах пятен крови «Первой группы» проведена оценка ферментативной активности α -гал А и концентрации субстрата лизо-Гб3 методом ВЭЖХ МС/МС.

в образцах пятен крови «Второй группы» (с подозрением на атипичную форму БФ), проведено молекулярно-генетическое исследование методом ВПС для исключения различных мутаций, приводящих к БФ.

Четвертый этап. Проведение молекулярно-генетической диагностики кодирующих и прилегающих интронных областей гена *GLA* в группе пациентов с подозрением на классическую форму БФ, имеющих сниженную активность фермента α -гал А и/или повышенную концентрацию субстрата лизо-Гб3, включающую выделение геномной ДНК, полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и секвенирование по методу Сэнгера.

Исследование ферментативной активности α -гал А и концентрации лизо-Гб3 у пациентов с подозрением на атипичную форму БФ и патогенными, вероятно-патогенными вариантами, а также

с вариантами с неизвестной патогенной значимостью выявлены в результате массового параллельного секвенирования.

Пятый этап. Оценка диагностической значимости активности фермента α -гал А и концентрации субстрата лизо-Гб3 в выборке российских пациентов с БФ с помощью статистических программ.

Шестой этап. Оптимизировать алгоритм лабораторной диагностики БФ у российских пациентов.

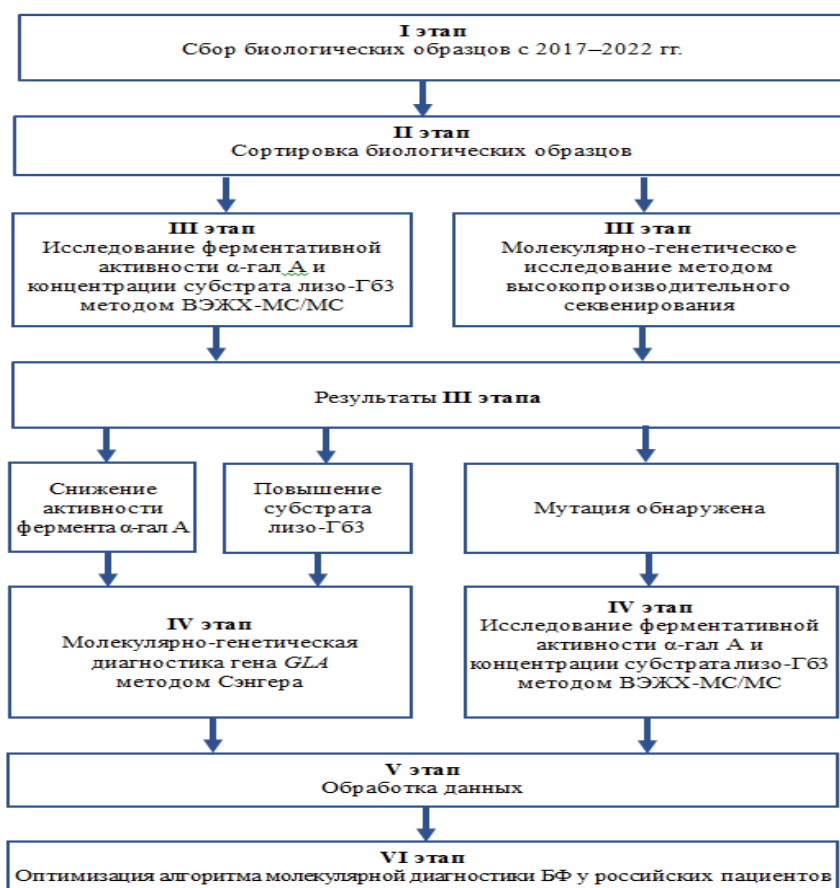


Рисунок 1 – Дизайн ретроспективно-проспективное нерандомизированное исследование

Лабораторные методы исследования

Биохимическое исследование активности фермента α -гал А и концентрации биомаркера лизо-Гб3 измеряли на тандемном масс-спектрометре Bruker Maxis Impact (Bruker Daltonics, Германия). Для измерения активности фермента использовали субстраты и внутренние стандарты, производимые компанией CDC (Centers for Disease Control and Prevention, США). Измерение концентрации лизо-Гб3 проводили с использованием внутреннего стандарта лизоцерамидтригексозида (Matreya, США). Хроматографическое разделение проводили с

⁴ QIAGEN. QIAamp® DNA Mini Blood Mini Handbook. 5th ed. 2016. URL:

<https://www.qiagen.com/ch/resources/download.aspx?id=62a200d6-faf4-469b-b50f-2b59cf738962&lang=en>.

⁵ Thermo Fisher Scientific. Applied Biosystems. BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protocol. URL:

https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LsG/manuals/cms_081527.pdf.

⁶ Roche. SeqCap EZ Library SR. User's Guide. URL: https://technical-support/roche/com/_layouts/net/pid/Download.aspx?documentID=ee33953e-0bf0-e711-4ebf-00215a9b3428&fileName=RSS.00215a9b3428&filename=RSS.

⁷ Genome Aggregation Database (gnomAD). URL: <https://gnomad.broadinstitute.org>.

помощью хроматографической колонки YMC-Triat C18, 50x2.0 (YMC, Япония) на хроматографе Agilent 1260 (Agilent, США).

Выделение геномной ДНК из крови осуществляли с помощью набора реактивов DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Германия) на автоматической станции QIAQUBE (QIAGEN, Германия), согласно протоколу производителя⁴. Качество и количество ДНК оценивалось при помощи спектрофотометра Nano Vue (GE Healthcare, Швеция), а также на флуориметре Qubit 3.0 (Invitrogen, США).

Олигонуклеотиды подбирали при помощи компьютерной программы Beacon Designer 8.10 (PREMIER Biosoft International, США). Синтез олигонуклеотидов производили в компании ЗАО «Евроген» Россия на автоматических синтезаторах ДНК (Applied Biosystems, США).

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на термоциклерах Bio-Rad T 100 (Bio-Rad, США) и ProFlex (Thermo Fisher Scientific, США) в 20 мкл смеси Amplitag Gold 360 (Thermo Fisher Scientific, США), содержащей 500 нмоль праймеров и 20-50 нг ДНК. Идентификацию продуктов реакции проводили в 1-2% агарозном геле, приготовленном из агарозы Biototechnology Grade (Amresco, США).

Секвенирование методом Сэнгера осуществляли при помощи набора реактивов BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, США) по протоколу и рекомендации производителя⁵. Высокопроизводительное секвенирование проводили с использованием набора реагентов Ion Pius Fragment Library Kit (Thermo Fisher Scientific, США) с последующим целевым обогащением гибридизации с биотинилированными пробами SeqCap EZ (Roche, США), согласно протоколу производителя⁶. Секвенирование обогащенных библиотек проводили на платформах MiSeq (Illumina, USA, San Diego) и NextSeq550DX (Illumina, USA, San Diego).

Анализ патогенности проводился для всех выявленных вариантов с частотой менее 1% по базе данных gnomAD⁷ v.2.1.1 и отсутствующих в базе данных HGMD professional (version 2020.1. June 2020). Классификация нуклеотидных вариантов по патогенности проводилась на основе биоинформатических модулей SIFT, PolyPhen-1, PolyPhen-2 и Mutation Tester, интегрированных в программу Alamut Visual Plus (version 1.5.1 SOPHiA GENETICS, Switzerland, Lausanne), а также с помощью руководства по интерпретации данных последовательности нуклеотидов ДНК человека⁹. Сравнение последовательностей нуклеотидов с базой данных GenBank Accession⁸ проводили при помощи программного обеспечения Geneious R10 (Biomatters, Новая Зеландия)

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате селективного скрининга, проведенного в период с 2017 по 2022 год в лаборатории молекулярной генетики и медицинской геномики Центра фундаментальных исследований в педиатрии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, было проанализировано 12256 сухих пятен крови, поступивших из разных регионов Российской Федерации, и разделенных на две группы. Группа пациентов с подозрением на классическую форму БФ составила 10300. Соотношение мужского пола к женскому полу в этой группе составило 8:1 соответственно (9167 пациентов мужского пола и 1133 пациентов женского пола).

Средний возраст на момент исследования у мужчин составил 35,7 года, а у женщин 42,5 года. Частота выявленных в этой группе случаев БФ составила 28 (0,27%) пациентов. Неравномерность распределения пациентов по полу связана с тем, что у гетерозиготных женщин сложнее заподозрить БФ. Группа пациентов с подозрением на атипичную форму БФ составила 1956. В этой группе соотношение мужского пола к женскому полу составило 2:1 (1369 мужского пола и 587 женского пола). Средний возраст на момент проведения исследования в этой группе составил у женщин 57 лет, а у мужчин 51,6 года, которым был поставлен диагноз ГКМП. Число выявленных в этой группе случаев БФ составило 8 (0,41%) пациентов (таблица 1).

Определение активности фермента α -галактозидазы А в сухих пятнах крови в группе пациентов с классической формой болезни Фабри

Значения ферментативной активности α -гал А в сухих пятнах крови с медианой, средним, интерквартильным размахом, максимальными и минимальными значениями в группе пациентов с патологическими вариантами гена *GLA*, а также в контрольной группе представлены в табличном (таблица 1) и графическом (рисунок 2) виде. Оптимальная отрезная точка для определения ферментативной активности α -гал А составила 1,89 мкмоль/литр/ч, что соответствует зарубежным данным.

Таблица 1 – Показатели ферментативной активности α -гал А в группе пациентов с БФ и контрольной группе

Параметр сравнения	Группа пациентов с БФ	Контрольная группа
Число пациентов	28	100
мужчины	22	76
женщин	6	24
Активность фермента α -гал А, мкмоль/л/час	0,23–4,34	2,23–19,20
медиана	0,75	6,23
среднее	0,97 \pm 0,9	6,09 \pm 3,7

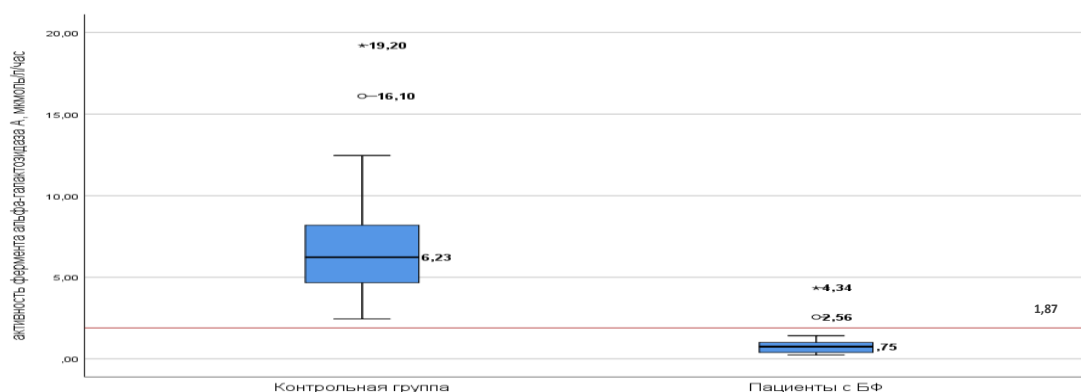


Рисунок 2 – Сравнение значений ферментативной активности α -гал А в группе пациентов с БФ и контрольной группе.

⁸ Рыжкова О.П., и др. Руководства по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2) // Медицинская генетика.2019. Т. 18, №2. С. 3-23.

⁹ GenBank Accession URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>.

Определение концентрации глоботриаозилфингозина в сухих пятнах крови в группе пациентов с классической формой БФ

Значения концентрации субстрата лизо-Гб3 в сухих пятнах крови с медианой и интерквартильным размахом, максимальными и минимальными значениями в группе пациентов с БФ, а также в контрольной группе представлены в табличном (таблица 2) и графическом виде (рисунок 3). . Оптимальная отрезная точка для определения лизо-Гб3 составила 2,02 нг/мл.

Таблица 2 – Показатели концентрации биомаркера лизо-Гб3 в группе пациентов с БФ и контрольной группе

Параметр сравнения	Группа пациентов с БФ	Контрольная группа
Число пациентов	28	100
<i>мужчины</i>	22	76
<i>женщин</i>	6	24
Концентрация лизо-Гб3, нг/мл	2,45–83,58	0,05–1,94
<i>медиана</i>	21,08	0,67

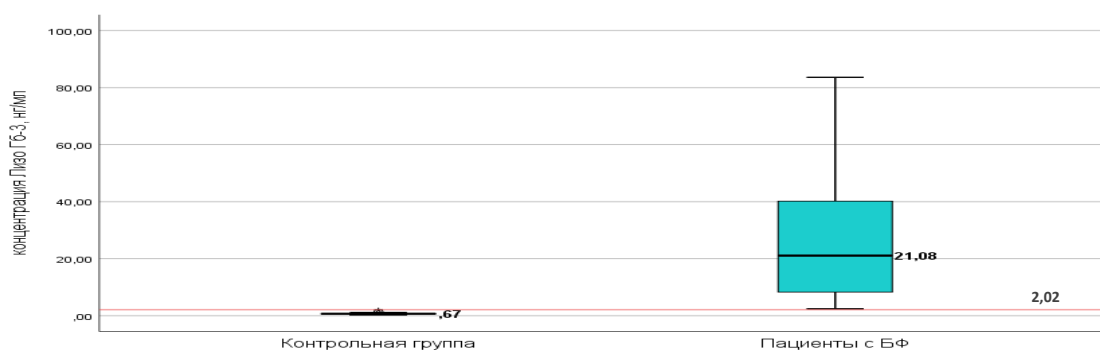


Рисунок 3 – Сравнение значений концентрации субстрата лизо-Гб3 в группе пациентов с БФ и контрольной группе.

Распределение пробандов по данным селективного скрининга пациентов с подозрением на классическую форму болезни Фабри в выборках из населения Федеральных округов России (2017-2021гг) по данным настоящего исследования

За период проведения исследования общее число пробандов с верифицированным диагнозом «болезнь Фабри» составило 28 больных. Распределение пробандов с БФ, выявленных по результатам предложенного алгоритма селективного скрининга, по Федеральным округам показано на рисунке 4 и в таблице 4.



Рисунок 4 – Распределение пробандов с болезнью Фабри по федеральным округам России

Наибольшее число случаев БФ выявлено в Центральном Федеральном округе (39,3%) и наименьшее число пробандов в Дальневосточном Федеральном округе (3,6%) (таблица 4).

Таблица 3 – Оценки выявляемости классической формы болезни Фабри в выборках групп риска по Федеральным округам России

Федеральные округа РФ	Численность населения	Число образцов	Число случаев, абс. (%)	Выявляемость в группе риска (%)
Центральный	39 250960	2628	11(39,3)	0,42
Приволжский	29 070827	1834	4(14,3)	0,22
Сибирский	17 003027	1569	2(7,1)	0,13
Южный	16 482488	1352	2(7,1)	0,15
Северо-Западный	13 941959	945	4(14,3)	0,42
Уральский	12 329 0	1422	2(7,1)	0,14
Северо-Кавказский	9 967301	256	2(7,1)	0,78
Дальневосточный	8 124053	294	1(3,6)	0,34
Всего:	146170 115	10300	28 (100)	0,27

Поскольку количество образцов биологического материала в среднем пропорционально числу жителей соответствующего федерального округа можно предположить, что полученная обобщенная оценка выявляемости болезни Фабри в группах повышенного риска в первом приближении может быть равной 0,27%

Представляет определенный интерес рассмотрение распределения выявленных случаев БФ по субъектам РФ. Так, в Центральном федеральном округе, который включает в себя 18 субъектов РФ с общей численностью населения более 39250000 человек, 7 из 11 пробандов являлись резидентами г. Москвы и МО, общая численность которых составила примерно 21690000 человек (на 2022 г.). В оставшихся 16 субъектах Центрального федерального округа с численностью резидентов 17560000 выявлено 4 больных. Таким образом, оценки выявляемости, приведенные к численности населения субъектов Центрального федерального округа, в целом отражают однородность показателя.

Иная картина отмечена в Северо-Западном и Приволжском Федеральных округах. Например, в Приволжском федеральном округе, который включает в себя 6 республик и 7 областей с общей численностью населения примерно 28830000 человек, в результате селективного скрининга выявлено 4 больных. Двое больных являлись резидентами г. Уфы (население 1835000 человек) и двое больных – резиденты г. Нижний Новгород (население 1234000). Таким образом, оценка выявляемости, проведенная только на городской выборке из 1/10 части населения Приволжского федерального округа, далека от ее реальных значений.

По - видимому одной из причин низкого выявления БФ является недостаточность осведомленности врачей общей практики о первых, неспецифических клинических проявлениях такого редкого (орфанного) заболевания как БФ.

Принимая среднюю частоту БФ, оцененную у новорожденных мальчиков нескольких стран равную 1:3000 и среднюю продолжительность жизни больных БФ (примерно 58 лет), теоретически минимальное количество случаев БФ среди лиц мужского пола в России может составить не менее 14 тысяч человек.

В связи с вышеизложенным, оценка распространенности БФ в Российской Федерации, рассчитанная по данным селективного скрининга в настоящее время далека от истинной.

Характеристика клинических проявлений пациентов с классической формой болезни Фабри

У всех 28 пациентов с классической формой БФ, выявленных при селективном скрининге, проведен анализ фенотипических проявлений БФ. Большинство пациентов (20/71%) демонстрировало манифестацию болезни на первом десятилетии жизни с акропарестезий (9/32%) и гипогидроза (19/68%). В большинстве случаев (25/90%) пациенты с БФ имели кардиологическую патологию (фиброз миокарда, изменения клапанов сердца, ГКМП, утолщение стенок сердца, желудочковые аритмии, стенокардию, нарушения проводимости). Симптомы поражения ЦНС проявлялись у (22/82%) пациентов в виде нейропатической боли (акропарестезии) и кризов Фабри, которые чаще всего проявлялись сильной колющей болью в стопах и ладонях при изменении погоды, отражаясь в проксимальных отделах конечностей. У многих пациентов (19/68%) отмечались гипогидроз или ангидроз в сочетании с уменьшением слюно- и слезоотделения. Большинство пациентов (17/61%) имели сниженную функцию почек, микроальбуминурию, с прогрессированием протеинурии и склероза почек. Желудочно-кишечными расстройствами страдали (16/57%) пациентов, отмечая болевые ощущения после приема пищи, тошноту, вздутие живота и частые диареи. Более, чем у половины пациентов (15/54%) отмечалось наличие кожных проявлений в виде высыпаний – ангиокератом. Общая клиническая характеристика пациентов с БФ представлена на рисунке 5.

Для женщин с БФ характерна легкая форма течения болезни с более поздней манифестацией клинических проявлений и редким классическим фенотипом.

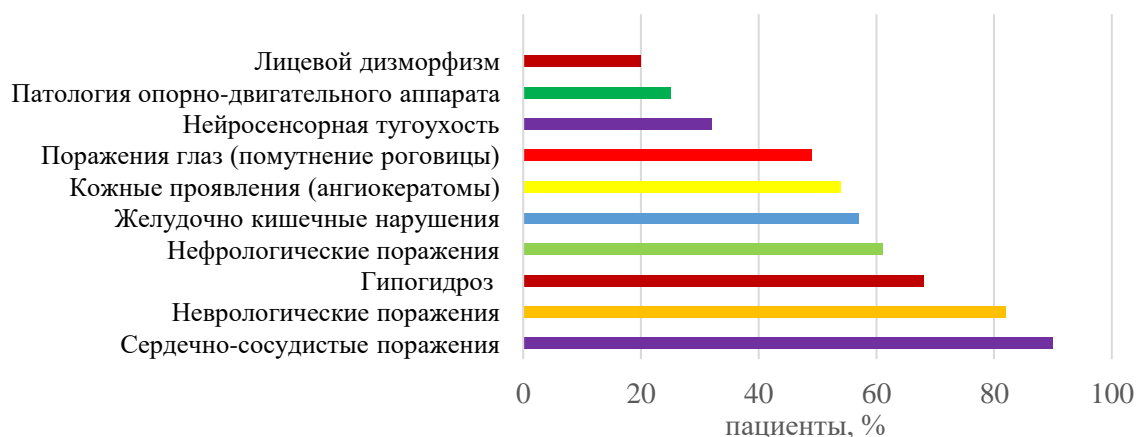


Рисунок 5 – Клинические проявления БФ у выявленных нами пациентов.

Семейные случаи с классической формой БФ

При исследовании 28 пробандов с классической формой БФ, выявленных при селективном скрининге, в 10 (35,7%) случаях пациентов с БФ были единственными заболевшими в семье. А доля семейных случаев БФ в нашем исследовании составила 18 (64,3%), (рисунок 6).

В совокупности у первичных пробандов в одной семье выявлено в среднем по 4 родственника обоих полов с БФ. Диагноз БФ родственникам был поставлен на основании молекулярно-генетического анализа известных патогенных вариантов гена *GLA* методом секвенирования по Сэнгеру.

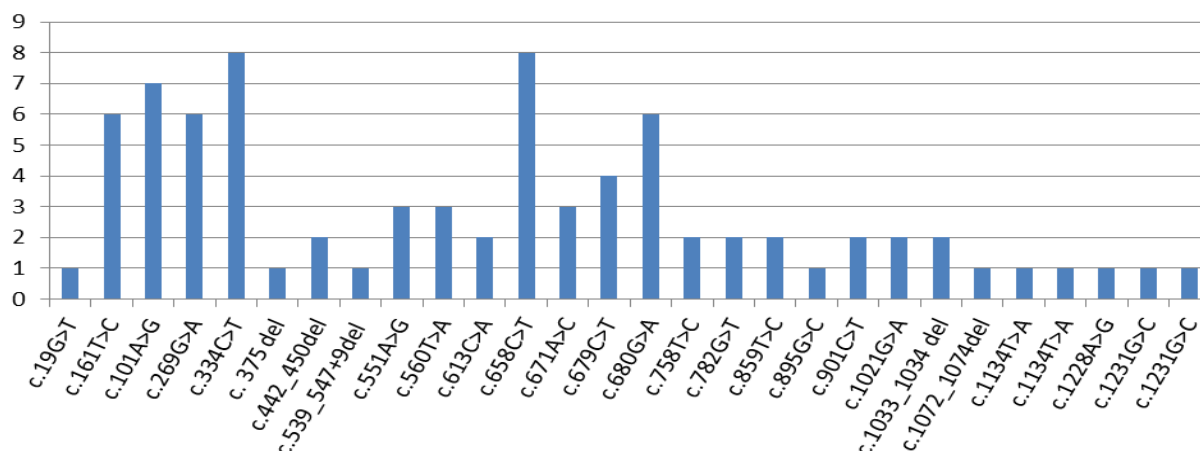


Рисунок 6 – Структура семейных случаев БФ

Селективный скрининг российских пациентов с подозрением на атипичную форму БФ методом высокопроизводительного секвенирования

Для выявления атипичной формы БФ среди российских больных с ГКМП был проведен селективный скрининг 1956 российских пациентов методом ВПС. По данным биоинформатического анализа были выявлены 12 (0,6%) пациентов с атипичной формой БФ (5 (41,7%) мужчин и 7 (58,3%) женщин) в возрасте $60,4 \pm 9,2$ лет с генетическими вариантами в гене *GLA*. Это согласуется со средними зарубежными данными соответствующих скрининговых программ на БФ, проводившихся в когортах больных с кардиологическими заболеваниями, включающими ГКМП, на протяжении последних лет (таблица 4).

Таблица 4 – Российские пациенты с атипичной формой БФ, проявляющиеся ГКМП, выявленные в ходе исследования, геном которых содержит патогенные, вероятно патогенные варианты, а также варианты с неизвестной клинической значимостью в гене *GLA*.

№ п/п	Пол	Возраст, лет	Нуклеотидный вариант, аминокислотный вариант	α -гал А, мкмоль/л/ч	лизо-Гб3, нг/мл	Тип мутации	Анализ патогенности	Описание в базе HGMD
1	м	51	<i>c.640-794_640-791del</i>	4,57	1,20	делеция	вероятно доброкачественный (PM2, BS3, BP7)	не описана
2	ж	68	<i>c.1288_1289dup, p.(X430FextX?)</i>	0,88	4,60	дупликация	патогенный (PS3, PS2, PM2, PM4)	не описана
3	м	45	<i>c.546T>C, p.(Asp182Asp)</i>	3,86	0,24	миссенс	вероятно доброкачественный (PM2, BS3,	не описана

							BP7)	
4	ж	69	<i>c.427G>A, p.(Ala143Thr)</i>	5,46	0,47	миссенс	неизвестная клиническая значимость (PM1, PM5, PP2, PP3, BS2, BS3)	да
5	м	42	<i>c.902G>A, p.(Arg301Gln)</i>	0,22	7,40	миссенс	патогенный	да
6	ж	64	<i>c.967C>A, p.(Pro323Thr)</i>	2,36	2,05	миссенс	(PS3, PS4, PM1, PM2, PM5, PP1, PP2, PP3)	да
7	ж	69	<i>c.971T>G, p.(Leu324Trp)</i>	4,25	0,79	миссенс	патогенный	да
8	ж	49	<i>c.897C>A, p.(Asp299Gln)</i>	1,82	3,06	миссенс	(PS3, PM1, PM2, PP2, PP3)	не описана
9	ж	10	<i>c.899T>C, p.(Leu300Cys)</i>	4,02	2,95	миссенс	неизвестная клиническая значимость (PM2, PM5, PP2, PP3, BS3)	да
10	м	53	<i>c.902G>A, p.(Arg301Gln)</i>	0,42	6,94	миссенс	патогенный (PS3, PM1, PM2, PM5, PP2, PP3, PP5)	да
11	ж	66	<i>c.782del, p.(Gly261Valfs*8)</i>	3,77	3,73	делеция	патогенный	не описана
12	м	67	<i>c.644A>G, p.(Asn215Ser)</i>	0,66	5,46	миссенс	(PS3, PS4, PM1, PM2, PM5, PP2, PP3)	да

В нашем случае среди 12 пациентов с патогенными, вероятно патогенными вариантами, а также с вариантами с неизвестной клинической значимостью, обнаруженными в результате селективного скрининга, анализ биохимических маркеров позволил выявить трех мужчин и четырех женщин с аномальным значением лизо-ГБ3, три женщины из числа которых были с нормальной активностью α -гал А. И пять пациентов со сниженной активностью фермента α -гал А, трех мужчин и двух женщин, имевших повышенные значения лизо-ГБ3 (рисунок 7).

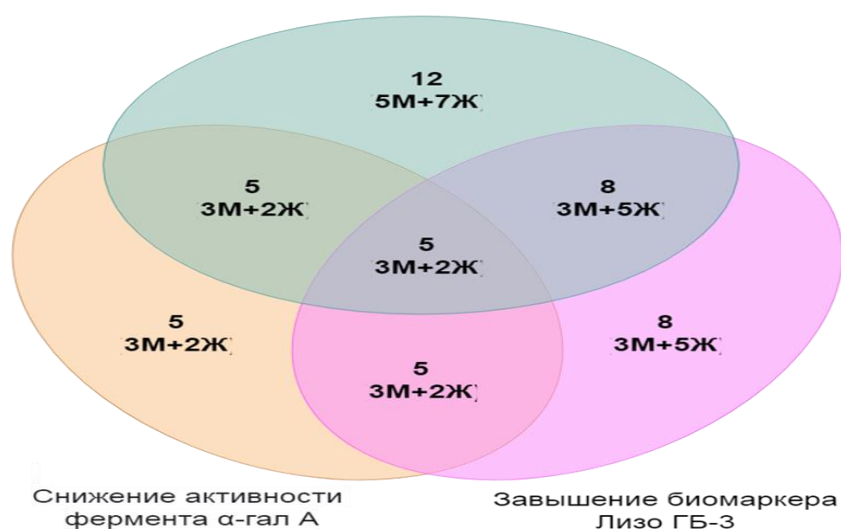


Рисунок 7 – Российские пациенты с атипичной формой БФ, проявляющиеся ГКМП, с изменениями активности фермента α -гал А и концентрации лизо-ГБ3.

Молекулярно-генетическое исследование

В результате молекулярно-генетического исследования пробандов, нами было выявлено 36 различных вариантов в гене *GLA* у 36 пациентов с классической и атипичной формой БФ 23 (64%) варианта – миссенс, 4 (11%) – нонсенс, 3 (8%) – фреймшифт (сдвиг рамки считывания), 3 (8%) – делеции, 2 (6%) – сайт спласинга и 1 (3%).

В результате селективного скрининга 12456 пациентов с классической и атипичной формой в гене *GLA* идентифицировано у 36 пробандов 33 различных нуклеотидных вариантов. В выявленных повторных мутациях родства не обнаружено. Мажорных мутаций не выявлено. Мутации были выявлены во всех 7 экзонах гена *GLA* с преобладающими долями в экзонах 7 (25%), 6 (19%) и 5 (22%), а с наименьшей долей в экзоне 2 (6%).

Новые патогенные варианты были обнаружены в единственном числе у пациентов с БФ: *c.269G>A*, *p.(Cys90Tyr)*; *c.375del*, *p.(His125Glnfs*5)*; *c.442_450del*, *p.(Ser148_Gly150del)*; *c.539_547+9del*, *p.(Leu180_Gly183delinsC)*; *c.551A>G*, *p.(Tyr184Cys)*; *c.560T>A*, *p.(Met187Lys)*; *c.782del*, *p.(Gly261Valfs*8)*; *c.895G>C*, *p.(Asp299His)*; *c.897C>A*, *p.(Asp299Gln)*; *c.1134T>A*, *p.(Cys378*)*; *c.1231G>C*, *p.(Gly411Arg)*; *c.1288_1289dup*, *p.(X430FextX?)*. Что характерно для подобных исследований, проведенных за рубежом, и указывает на высокую популяционную вариабельность в когорте российских пациентов. 12 (36%) новых патогенных вариантов гена *GLA* дополняют базу HGMD, составляя почти 1,0% всех описанных в ней мутаций гена *GLA*, вызывающих БФ.

Молекулярное разнообразие 36 пробандов, выявленных в настоящем исследовании патогенных вариантов гена *GLA*, было характерно для всех 7 экзонов гена (рисунок 8).

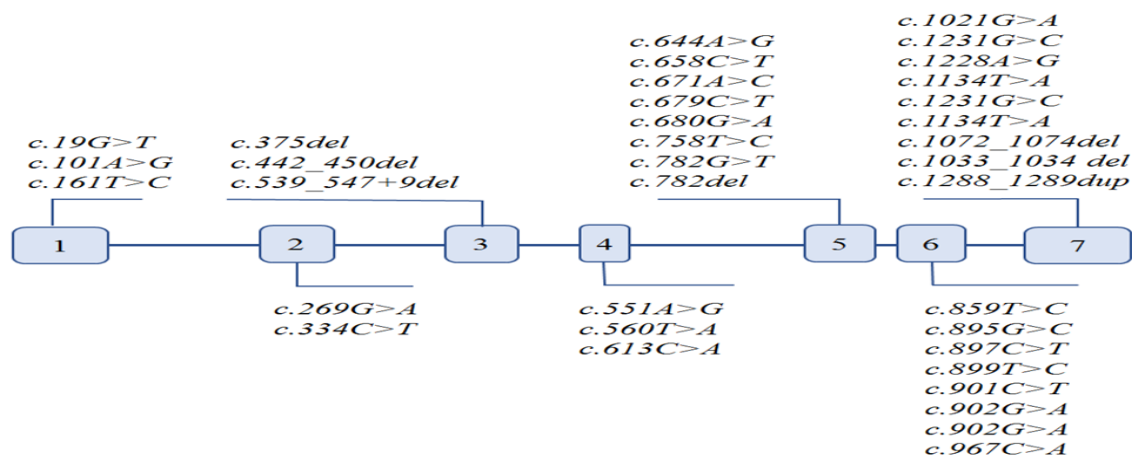


Рисунок 8 – Молекулярное разнообразие выявленных мутаций в различных экзонах гена *GLA* (1–7 – номера экзонов гена *GLA*)

Анализ фенотип-генотипических взаимосвязей при болезни Фабри

Для выявления и оценки генотип-фенотипических корреляций был проведен анализ взаимосвязи патогенных вариантов гена *GLA* с биохимическими показателями, а также рядом клинических проявлений.

С использованием статистических тестов рассчитывались взаимосвязи между патогенными вариантами гена *GLA*, выявленными при классической форме заболевания и значениями

концентрации биомаркера лизо-Гб3 с полом пробандов, наличием у пациентов инсультов, тХПН, а также тХПН в сочетании с инсультом.

Результаты проведенных исследований позволили выявить некоторые закономерности.

Как видно из данных, приведенных в таблице № 5, медиана концентрации лизо-Гб3 у обследованных мужчин в 5 раз выше медианы концентрации лизо-Гб3 у женщин. Результаты статистического теста ($p=0,009617$) позволили говорить о достоверности различий концентрации биомаркера лизо-Гб3 у больных БФ в зависимости от половой принадлежности.

Таблица 5 – Определение различий концентрации лизо-Гб3 в зависимости от пола пациентов

Параметр	пол		р-значение
	мужчины	женщины	
Концентрация субстрата лизо-Гб3, нг/мл	31,1(18,0–44,4)	5,36(4,1–16,6)	0,009617

Концентрации лизо-Гб3 представлены значениями медианы и квантилями распределения признаков (25%–75%).

При наблюдении за клинической динамикой течения болезни Фабри было отмечено, что в 45% случаев развиваются инсульты или окклюзии мелких сосудов головного мозга и примерно в 46% первый инсульт диагностирован до постановки диагноза БФ.

Позднее в ряде публикаций сообщалось о повышенной частоте определённых патологических вариантов гена *GLA* у пациентов с инсультами.

Учитывая эти данные, для оценки взаимосвязи частоты инсультов (ишемических и геморрагических) с типами патогенных вариантов гена *GLA* были сформированы две выборки больных. В первую выборку включены 9 пациентов с «количественными» генетическими вариантами гена *GLA*, которые были представлены мутациями «сдвига рамки считывания» и нонсенс вариантами, преждевременно прерывающими синтез кодируемых белков. Вторая выборка была представлена 12-тью пациентами с «качественными» вариантами гена *GLA*, которые были представлены любыми другими миссенс-мутациями, таблица 6.

Таблица 6 – Частоты инсультов в выборках пациентов с «количественными» и «качественными» вариантами гена *GLA* у пациентов с БФ

Мутации	Пациенты с БФ		р-значение
	с инсультом	без инсульта	
Количественные	6	3	0,08723
Другие	3	9	

При исследовании взаимосвязи между типом патогенных вариантов гена *GLA* и инсультами нами выявлена тенденция к увеличению числа пациентов с инсультами в группе больных с «количественными» мутациями. Вместе с тем результаты обсчета с использованием точного критерия Фишера не достигли статистической значимости (p -значение = 0,08723).

Мы предполагаем, что при увеличении выборки обследуемых пациентов эта тенденция может стать статистически достоверной. При разделении групп по полу достоверной ассоциации с типом мутаций также обнаружить не удалось (таблица 7 и 8).

Таблица 7 – Частоты инсультов в группах женщин с «количественными» и «качественными» вариантами гена *GLA*

Мутации	Женщины		р-значение
	с инсультом	без инсульта	
Количественные	4	0	0,1429
Другие	1	2	

Таблица 8 – Частоты инсультов в группах мужчин с «количественными» и «качественными» вариантами гена *GLA*

Мутации	Мужчины		р-значение
	с инсультом	без инсульта	
Количественные	2	3	0,5804
Другие	2	7	

Нами не было выявлено различий между типом патогенных вариантов гена *GLA* и значениями концентрации биомаркера лизо-Гб3 у исследуемых пациентов. Расчет взаимосвязей между уровнем биомаркера лизо-Гб3 и типом патогенных вариантов гена *GLA* с одной стороны, и наличием у пациентов инсультов, тХПН и тХПН в сочетании с инсультом с другой стороны, также не дал статистически значимых результатов.

Критерий контроля эффективности ферментозаместительной терапии у пациентов с классической формой БФ

Целью назначения ферментозаместительной терапии (ФЗТ) пациентам с БФ, является улучшение качества жизни пациентов, предотвращение прогрессирования болезни и необратимого повреждения, как отдельных органов, так и различных систем организма. В ходе селективного исследования нами была измерена концентрация биомаркера лизо-Гб3 у 28 пациентов с классической формой БФ, диагноз которым был подтвержден молекулярно-генетическими методами. У этих же пациентов измеряли концентрацию лизо-Гб3 до и после применения ФЗТ препаратом агалсидаза альфа. В группе мужского пола при измерении концентрации лизо-Гб3 до ФЗТ и во время ее проведения наблюдается статистически значимое снижение на фоне приема препаратов ($p=0,00007$), усредненная разница концентрации составила 5 раз. В группе женщин, находящихся на патогенетической терапии, наблюдалось статистически значимое снижение концентрации лизо-Гб3 ($p=0,002$), усредненная разница составила 1,7 раза. В обеих группах при повторных измерениях концентрации лизо-Гб3 после ФЗТ значения биомаркера приближались к референсным значениям (норма $< 2,1$ нг/мл). Это позволяет говорить о том, что критерием контроля эффективности применения ФЗТ терапии препаратом агалсидаза альфа может служить концентрация биомаркера лизо-Гб3, которая представлена на рисунке 9.

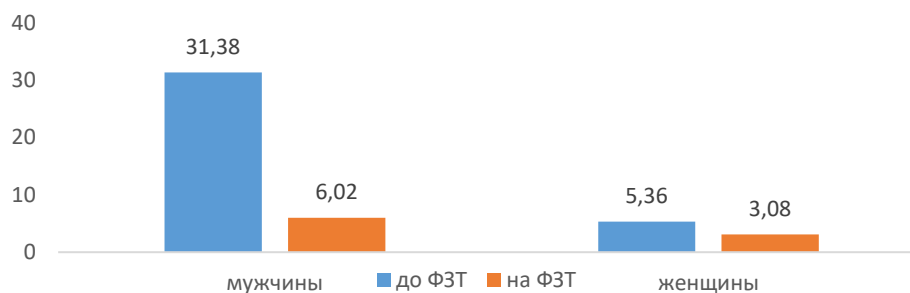


Рисунок 9 – Различия в концентрациях лизо-Г63 у мужчин и женщин до ФЗТ и на ФЗТ.

Оптимизация алгоритма комплексной клинико-лабораторной диагностики болезни Фабри.

Для оптимальной диагностики БФ у российских пациентов нами изучены анамнезы пациентов, в том числе данные о наследственности, возрасте манифестации болезни, возрасте постановки диагноза, обращаемости с жалобами к врачам различных специальностей. Кроме того, нами проанализированы и оценены заключения врачей различных специальностей, а также данные клинических, лабораторных, инструментальных исследований, проводимых при постановке диагноза. Это позволило определить наиболее значимые характеристики БФ, сравнить их с данными зарубежных исследователей, что послужило основанием для усовершенствования диагностики БФ у российских пациентов.

В ходе настоящей работы разработан и оптимизирован алгоритм диагностики классической и атипичной формы БФ на основе измерения концентрации биомаркера лизо-Г63 в качестве первичного теста у пациентов с подозрением на классическую форму БФ, а также использования высокопроизводительного секвенирования у пациентов с ГКМП и подозрением на атипичную форму (рисунок 10).



Рисунок 10 – Оптимизированный алгоритм диагностики пациентов с классической формой БФ.

Разработан алгоритм диагностики атипичной формы БФ у пациентов с ГКМП (рисунок 11).

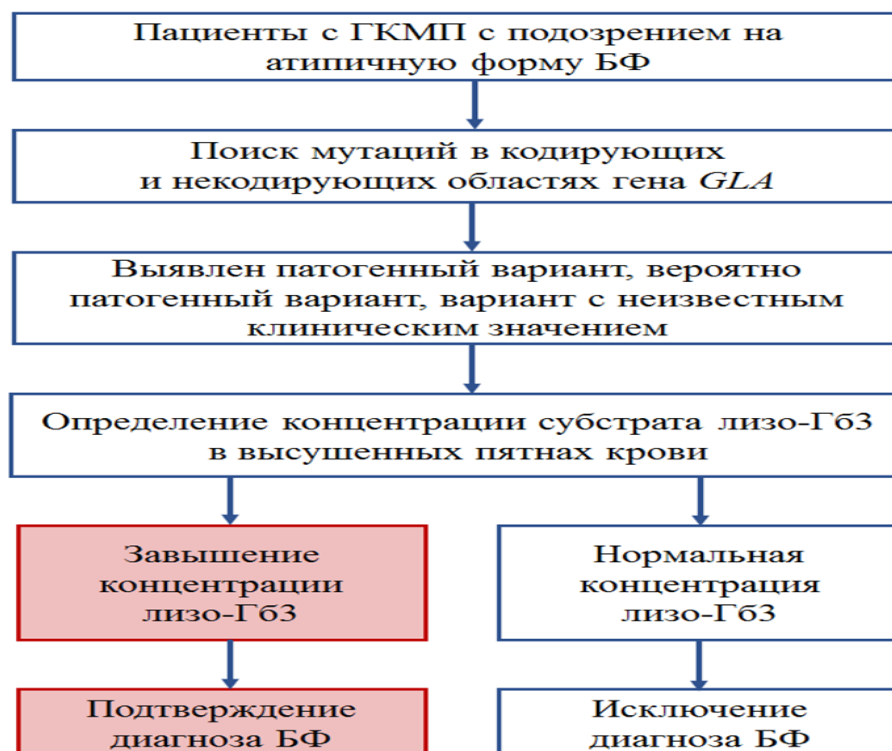


Рисунок 11 – Разработанный алгоритм диагностики БФ в качестве первичного теста определения биомаркера лизо-Гб3 у пациентов с атипичной формой БФ.

Внедрение разработанных алгоритмов диагностики позволяет в значительной степени повысить точность диагностики БФ, оптимизировать мониторинг и лечение патологии на ранних этапах, повысить эффективность оказания медицинской помощи пациентам с БФ в РФ. Предложенные алгоритмы позволяют снизить временные, физические и психологические риски, а также уменьшить расходы и стать экономически выгодным для здравоохранения страны при селективном скрининге БФ в российской популяции.

ВЫВОДЫ

1. На основе селективного скрининга 12256 российских пациентов с подозрением на болезнь Фабри обобщенная оценка выявляемости заболевания составила 0,29%. С учетом выполненного анализа у 88 человек впервые была диагностирована болезнь Фабри.

2. В исследованной выборке пациентов с подозрением на БФ классический фенотип заболевания выявлен у 28 пробандов, в семьях которых дополнительно диагностировано 52 пациента с болезнью Фабри; в выборке лиц с подозрением на атипичную форму заболевания, проявляющуюся гипертрофической кардиомиопатией, выявлено 8 пробандов (0,41%) с болезнью Фабри.

3. Показано, что определение концентрации глоботриаозилсфингозина методом тандемной масс-спектрометрии, чувствительность и специфичность которого составила 100%, может являться тестом первого уровня для диагностики классической формы болезни Фабри у пробандов обоих полов из групп повышенного риска.

4. Идентифицированы 33 различных каузальных варианта гена *GLA* у 28 пробандов с классической и 8 - с атипичной формой БФ, 70% из которых локализованы в экзонах 5, 6 и 7 гена *GLA*. 12 нуклеотидных вариантов ранее не были аннотированы в международной базе HGMD: 6 вариантов представлены различными уникальными миссенс мутациями; один вариант - нонсенс-мутацией, четыре варианта - небольшими делециями и один вариант - дупликацией, приводящей к потере стоп-кодона.

5. В результате анализа взаимосвязей специфичности генотипа с тяжестью клинических проявлений, различий между уровнем биомаркера лизо-Гб3, типом патогенных вариантов гена *GLA* и наличием у пациентов тХПН, а также тХПН в сочетании с инсультом не выявлено.

6. Впервые разработан алгоритм комплексной лабораторной диагностики атипичной формы болезни Фабри с использованием технологии высокопроизводительного секвенирования и усовершенствован алгоритм диагностики классической формы болезни Фабри, оправданные для применения у российских пациентов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В целях оптимизации процесса диагностики БФ в качестве теста первого уровня рекомендуется оценка концентрации субстрата лизо-Гб3 пациентам обоих полов с подозрением на классическую форму заболевания.

2. Для диагностики пациентов с атипичной формой БФ рекомендуется применение технологии высокопроизводительного секвенирования в качестве теста первого уровня.

3. Болезнь Фабри характеризуется высокой частотой повторных случаев среди родственников пробандов. В этой связи рекомендуется обследовать других членов родословной, а также проводить динамическое наблюдение за состоянием здоровья бессимптомных пациентов, имеющих каузальные варианты гена *GLA*.

4. Биомаркер лизо-Гб3 может быть использован в качестве критерия контроля эффективности ферментозаместительной терапии у пациентов мужского пола с БФ.

5. При планировании беременности пациенткам с БФ и родственникам с каузальными вариантами гена *GLA* рекомендуется медико-генетическое консультирование. Применение современных репродуктивных технологий, основанных на молекулярно-генетических подходах, позволит обеспечить рождение здорового ребенка.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дальнейшее изучение концентрации лизо-Гб3 у детей в неонатальном периоде, в том числе у детей с мутациями гена *GLA* изотягощенных семей в качестве первичного биомаркера позволит определить целесообразность его использования при проведении скрининга новорожденных на БФ.

Дальнейшее определение спектра патогенных вариантов гена *GLA* у российских пациентов из различных регионов позволит оптимизировать медико-генетическую помощь пациентам с БФ, а также будет способствовать разработке персонифицированной патогенетической терапии.

Продолжение изучения корреляций генотипа и фенотипа у пациентов с классической и атипичной формой БФ при помощи увеличения выборки позволит использовать накопленные данные (клинические, биохимические, географические и молекулярно-генетические) для пополнения регистра БФ, который в обозримом будущем может стать инструментом для определения прогноза и корреляции терапии конкретных пациентов из Российской Федерации.

СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Мазанова Н.Н.** Роль глоботриаозилсфингозина в диагностике болезни Фабри у российских пациентов / **Мазанова Н.Н.**, Пушков А.А., Пахомов А.В., Асанов А.Ю., Савостьянов К.В. // Медицинская генетика. 2020. Т. 19. № 7 (216). С. 81-82.

2. **Мазанова Н.Н.** Современные представления о клинике, диагностике и терапии болезни Фабри. Обзор литературы / **Мазанова Н.Н.**, Асанов А.Ю., Чебеляев И.Ю., Баканов М.И., Савостьянов К.В. // Медицинская генетика. 2021. Т.20. №6 (227). С.3-13.

3. Русакова А.А. Семейный случай болезни Фабри / Русакова А.А., Мазанова Н.Н., Пушков А.А., Савостьянов К.В. // В сборнике: Орфанные болезни. Материалы I Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Москва, 2022. С. 66-69.

4. K. Savostyanov. The prevalence of Fabry disease among 1009 unrelated patients with hypertrophic cardiomyopathy: a Russian nationwide screening program using NGS technology / K. Savostyanov, A. Pushkov, I. Zhanin, **N. Mazanova**, S. Trufanov, A. Pakhomov, A. Alexeeva, D. Sladkov, A. Asanov, A. Fisenko. // Orphanet Journal of Rare Diseases. 2022; 17 (1).199.

5. Savostyanov K. LYSO-GB3 IS AS A PRIMARY BIOMARKER FOR FABRY DISEASE SCREENING AMONG HIGH-RISK CONTINGENTS / Savostyanov K., Pushkov A., **Mazanova N.**, Pak L., Kuzenkova L., Podkletnova T., Pakhomov A., Sukhozhenko A., Moiseev S. // Molecular Genetics and Metabolism. 2019. Т. 126. № 2. С. S130-S131.

6. Savost'Anov K. CORRELATION OF LYSO-GB3 LEVEL AND GLA MUTATIONS IN PATIENTS FROM SCREENING COHORT AMONG DIALYSIS CENTERS IN RUSSIAN FEDERATION / Savost'Anov K., Namazova-baranova L., Pushkov A., **Mazanova N.**, Khrapov A., Pen'Kov E. // Journal of Inborn Errors of Metabolism & Screening. 2017. Т. 5. 326.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

α -гал А – фермент α -галактозидазы А

БФ – болезнь Фабри

ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией

Лизо-Гб3 – биомаркер глоботриаозилсфингозин

ЛБН – лизосомные болезни накопления

ХБП – хроническая болезнь почек

FOS – Fabry Outcome Survey

OMIM – электронный каталог менделирующих заболеваний человека (Online Mendelian Inheritance in Man)

РЕЗЮМЕ**кандидатской диссертации Мазановой Натальи Николаевны****Тема: «Оптимизация алгоритма молекулярной диагностики болезни Фабри в Российской Федерации»**

Представленная работа направлена на усовершенствование методики проведения селективного скрининга с классической и атипичной формы болезни Фабри (БФ) у российских пациентов. Данные, полученные в результате использования современной технологии тандемной масс-спектрометрии для определения активности фермента α -галактозидазы А и концентрации субстрата глоботраозилсфингозина, позволяют установить закономерности определенных процессов, происходящих в организме человека, страдающих БФ, а методы подтверждающей диагностики с применением технологии секвенирования ДНК позволяют выявить корреляции генотипа и фенотипа у пациентов с БФ. Диссертационное исследование показало возможность использования глоботраозилсфингозина в качестве первичного биомаркера. Выявлены новые патогенные варианты гена *GLA*, ранее не описанные в международной базе The Human Gene Mutation Database, а также описаны соответствующие им клинические признаки. Осуществлен комплексный подход к диагностике БФ и к мониторингу патогенетической терапии БФ в Российской Федерации. Охарактеризован спектр и типы мутаций у российских пациентов с классической и атипичной формы БФ. Предложен усовершенствованный алгоритм диагностики БФ, который может быть использован для выявления пациентов с классической и атипичной формой БФ и в группах повышенного риска и их своевременного специализированного клинического обследования с целью назначения персонализированной терапии.

SUMMARY**of the dissertation «Optimization of the molecular diagnostic algorithm for Fabry disease in the Russian Federation» by Mazanova Natalya Nikolaevna (Russian Federation)**

The presented work is aimed at improving the methodology for selective screening with classical and atypical forms of Fabry disease (FD) in Russian patients. Data obtained as a result of the use of modern tandem mass spectrometry technology to determine the activity of the enzyme α -galactosidase A and the concentration of the substrate globotriaosylsphingosine make it possible to establish the patterns of certain processes occurring in the body of a person suffering from FD, and confirmatory diagnostic methods using DNA sequencing technology make it possible to identify genotype-phenotype correlations in patients with FD. The dissertation research showed the possibility of using globotriaosylsphingosine as a primary biomarker. New pathogenic variants of the *GLA* gene, previously not described in the international database The Human Gene Mutation Database, have been identified, and their corresponding clinical signs have been described. A comprehensive approach to the diagnosis of FD and monitoring of the pathogenetic therapy of FD in the Russian Federation has been implemented. The spectrum and types of mutations in Russian patients with classical and atypical forms of FD are characterized. An improved algorithm for the diagnosis of CF is proposed, which can be used to identify patients with classical and atypical forms of FD and in high-risk groups and their timely specialized clinical examination in order to prescribe personalized therapy.