

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования Первый Московский государственный  
медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства  
здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

---

*На правах рукописи*

**Мазанова Наталья Николаевна**

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

1.5.7. Генетика

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

**Научный руководитель:**

академик РАН, доктор медицинских наук,  
профессор А.Ю. Асанов

**Научный консультант:**

доктор биологических наук К.В. Савостьянов

Москва 2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ: БОЛЕЗНЬ ФАБРИ – СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ.....	14
1.1. Лизосомные болезни накопления.....	14
1.2. Болезнь Фабри.....	16
1.2.1. Краткая справка об истории открытия и изучения болезни Фабри.....	16
1.2.2. Эпидемиология болезни Фабри.....	18
1.2.3. Этиология и патогенез болезни Фабри.....	20
1.2.4. Клинические особенности болезни Фабри.....	23
1.2.5. Особенности диагностики болезни Фабри.....	29
1.2.6. Общие принципы лечения болезни Фабри.....	41
1.2.7. Генотип-фенотипические связи болезни Фабри.....	46
1.3. Заключение.....	47
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	48
2.1. Этический контроль.....	48
2.2. Дизайн исследования.....	49
2.3. Материал для исследования.....	51
2.4. Лабораторные методы исследования.....	54
2.4.1. Биохимические методы исследования.....	55
2.4.2. Молекулярно-генетические методы диагностики болезни Фабри.....	59
2.5. Метод статистического анализа.....	63
2.6. Перечень требований к биоматериалу.....	64
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	66
3.1. Селективный скрининг болезни Фабри.....	66
3.1.1. Определение активности фермента $\alpha$ -галактозидазы А в сухих пятнах крови пациентов с классической формой болезни Фабри.....	67
3.1.2. Определение концентрации глоботриаозилсфингозина в сухих пятнах крови у пациентов с классической формой БФ.....	70

3.1.3. Выявление патогенных вариантов гена <i>GLA</i> методом секвенирования по Сэнгеру .....	73
3.1.4. Селективный скрининг российских пациентов с подозрением на атипичную форму БФ методом высокопроизводительного секвенирования .....	77
3.2. Характеристика группы пациентов с болезнью Фабри, выявленных в результате селективного скрининга.....	86
3.3. 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 .....	89
3.4. Общая характеристика пациентов контрольной группы .....	92
3.5. Характеристика клинических проявлений пациентов с классической формой болезни Фабри .....	93
3.6. Описание новых нуклеотидных вариантов гена <i>GLA</i> .....	96
3.7. Анализ фенотип-генотипических взаимосвязей при болезни Фабри.....	99
3.8. Критерий контроля эффективности ферментозаместительной терапии .....	101
3.9. Клинико-генеалогические особенности болезни Фабри .....	103
3.10. Оптимизация алгоритма клинико-лабораторной диагностики болезни Фабри .....	106
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	110
ВЫВОДЫ.....	112
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	114
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	115
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ .....	116
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	118

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** Болезнь Фабри (БФ) – является редким X-сцепленным наследственным заболеванием нарушения обмена гликофинголипидов, для которого характерно снижение активности лизосомальной  $\alpha$ -галактозидазы А (ЕС 3.2.1.22). Дефицит лизосомальной  $\alpha$ -галактозидазы А ( $\alpha$ -гал А) приводит к прогрессирующему накоплению токсических метаболитов (глоботриаозилцерамида (ГбЗ) и родственных ему гликофинголипидов, в том числе глоботриаозилсфингозина (лизо-ГбЗ)) 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 БФ [33].

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  $\alpha$ -гал А, но и происходит накопление токсических метаболитов, в связи с чем БФ относят к болезням накопления.

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  $\alpha$ -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. 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 фенотипов 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  $\alpha$ -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.** 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-ГбЗ 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.**

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-ГбЗ 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).

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  $\alpha$ -гал А на первом этапе у пациентов с подозрением на классическую форму БФ. Пациенты, у которых выявлено завышение лизо-Гб3 и/или снижение  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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 апробация результатов.** Высокая степень достоверности результатов диссертационного исследования подтверждается значительным числом проведенных исследований на репрезентативной выборке российских пациентов с подозрением на классическую и атипичную форму болезни 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  $\alpha$ -гал А и концентрации биомаркера лизо-Гб3 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 обчислительными 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, ICiEM (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. Генотоксикология. 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 и материалам диссертации подготовлены к публикации 6 печатных 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.

**Финансовая поддержка.** Работа выполнена без финансовой поддержки в рамках научно-исследовательских работ на кафедре медицинской генетики Института Клинической Медицины имени Н.В. Склифосовского (ФГАО УВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский

Университет) и в лаборатории молекулярной генетика медицинской геномики Центра фундаментальных исследований в педиатрии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ: БОЛЕЗНЬ ФАБРИ – СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ

### 1.1. Лизосомные болезни накопления

Лизосомные болезни накопления (ЛБН) – группа редких генетических заболеваний, насчитывающая более 50 нозологий. Причиной развития заболеваний является снижение либо отсутствие активности ферментов, необходимых для расщепления сложных молекул гликозаминогликанов, гликопротеинов, гликогена. И их дальнейшим накоплением в лизосомах клеток, что приводит к клеточной и органной гипертрофии.

Первопричиной развития всех ЛБН являются патогенные изменения референсных последовательностей нуклеотидов генов, вызывающие дефицитную активность кодируемых ферментов. Классификация ЛБН, учитывающая молекулярный и структурный дефект лизосом, включает группу болезней накопления E75.2 Другие сфинголипидозы, которая включает следующие нозологии:

- болезнь Фабри;
- болезнь Гоше (типы I, II, III, атипичная форма);
- болезнь Ниманна-Пика, тип А и В;
- метахроматическая лейкодистрофия;
- GM1-ганглиозидоз (типы I, II и III);
- GM2-ганглиозидоз (болезнь Тэя-Сакса, болезнь Зандхоффа);
- метахромная лейкодистрофия, сульфатидный липидоз;
- глободно-клеточная лейкодистрофия (болезнь Краббе),
- болезнь Фарбера;
- дефицит просапозина.

К общеклиническим проявлениям указанных болезней можно отнести следующие:

- 1) врожденный характер заболевания;
- 2) прогрессивное течение заболевания;
- 3) различные по продолжительности периоды относительно нормального развития ребенка;
- 3) вовлеченность в патологический процесс многих органов и систем организма;
- 4) задержка умственного и психического развития;

Схожесть клинической картины сфинголипидозов вызывает определенные трудности их диагностики, особенно в раннем возрасте, однако каждая нозологическая единица обладает патогномичными биохимическими и молекулярно-генетическими маркерами.

Тяжесть течения и возраст манифестации болезни зачастую определяются тяжестью повреждения кодируемого белка, возникающего в результате генетического дефекта, что и обуславливает в большинстве случаев клиническое разнообразие ЛБН (инфантильные, ювенильные и взрослые формы заболевания). У большинства пациентов при рождении не отмечаются признаки заболевания. Некоторые формы ЛБН отличаются бессимптомным течением, что не оказывает существенного влияния на продолжительность жизни пациента. Как правило, ЛБН характеризуются достаточно быстрым прогрессированием и в большинстве случаев приводят к существенному сокращению продолжительности жизни пациентов [141]. Характерными признаками ЛБН являются мультисистемность заболевания, когда вовлекается в патологический процесс несколько органов, и прогрессивное течение болезни [42]. После длительного бессимптомного состояния заболевание может проявиться резко и сильно. Разработка алгоритма диагностики ЛБН, в частности для атипичной формы БФ и оптимизация алгоритма диагностики для классической формы на сегодняшний момент обстоит высшей степени актуально для лиц из групп высокого риска.

Заместительная терапия ЛБН рекомбинантными препаратами широко используется во всем мире с 1991 года при лечении болезни Гоше, а при лечении БФ стала использоваться только с 2001 года [12]. В 2013 году Министерство здравоохранения Российской Федерации впервые разработало Федеральные клинические рекомендации по лабораторной диагностике БФ. Достижения современной медицины позволяют эффективно лечить многие ЛБН при помощи ферментозаместительной терапии (ФЗТ), уменьшая клинические проявления болезней [76, 121].

## **1.2. Болезнь Фабри**

Болезнь Фабри (МКБ-10: У75.2. МКБ-10 / E00-E90 КЛАСС IV Болезни, относящиеся к эндокринной системе, к расстройствам питания и нарушения обмена веществ) представляет собой редкое генетическое заболевание обмена веществ, обусловленное накоплением гликофинголипидов вследствие низкой ферментативной активности  $\alpha$ -галактозидазы А ( $\alpha$ -гал А), которая свою очередь обусловлена мутациям гена *GLA*. БФ была описана независимо двумя врачами У. Андерсоном и Д. Фабри в 1898 году, однако ввиду крайней редкости с единичными описаниями она была выделена в отдельную нозологию лишь в 1950 году. БФ и в настоящее время считается орфанным и труднодиагностируемым заболеванием прежде всего по причине существенного разнообразия клинических проявлений [7, 8].

### **1.2.1. Краткая справка об истории открытия и изучения болезни Фабри**

Исторические аспекты и этапы изучения болезни Фабри представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Болезнь Фабри: исторические аспекты и этапы изучения

Дата, год	Имя	Описание
1898	У. Андерсон, Д. Фабри	Немецкий дерматолог Джон Фабри описал 13-летнего мальчика с узелковой пурпурой и альбуминурией и предположил, что заболевание является разновидностью диффузной ангиокератомы [43]. Английский хирург Уильям Андерсон описал 39-летнего пациента с деформацией пальцев рук, варикозным расширением вен, протеинурией и ангиокератомами [16].
1947	A. Pompe	Первое описание БФ как болезни накопления. Pompe с коллегами описали аномальные вакуоли в кровеносных сосудах [110].
1953	H. Hornbostel, K. Scriba	Первое инструментальное подтверждение БФ при исследовании биопсийного материала кожи [57].
1962	D. Wise	Первое описание семейного характера БФ [143].
1963	C. Sweeley, B. Klionsky	БФ классифицировали как сфинголипидоз. Ученые сообщили, что патология микрососудов обусловлена накоплением сфинголипидов в лизосомах [134].
1965	D. P. Germain	Сообщается об X-сцепленном типе наследования БФ [48].
1967	R. Brady	Ученые определили, что в основе БФ лежит недостаточность лизосомального фермента $\alpha$ -гал А [26].
1970	J.A. Kint, K.M. Zeidner	Нефункциональный фермент [67]. Установлено, что снижение активности фермента $\alpha$ -гал А приводит к прогрессивному накоплению глоботриаозилцерамида и гликосфинголипидов в лизосомах [59].
1989	R. Kornreich	Секвенирование гена <i>GLA</i> обусловило возможность генно-инженерными методами синтезировать фермент <i>in vitro</i> и в дальнейшем успешно применять ФЗТ при БФ [69].
Наст. вр.		БФ классифицирована как ЛБН.

### 1.2.2. Эпидемиология болезни Фабри

БФ распространена по всему земному шару и встречается в подавляющем большинстве этнических групп. Принято считать, что частота заболевания в общей мировой популяции варьирует от 1:40 000 до 1:476 000 живых новорожденных [50, 101].

Созданный крупный международный многоцентровой регистр наблюдений Fabry Outcome Survey (FOS) в 2001 году в который вошла Россия и 25 стран. Регистр создан с целью изучения заболевания, получения данных об эффективности ФЗТ. В 2021 году регистр включал информацию о 4484 пациентов с БФ [20].

С 1999 по 2018 гг. были определены значительные различия в распространенности БФ в разных странах (таблица 2).

Таблица 2 – Распространенность болезни Фабри в различных странах

Государство	Год исследования	Распространенность БФ	Литература
Австралия	1999	0,0086 / 1 000	[91]
Нидерланды	1999	0,0021 / 1 000	[111]
Великобритания	2001	0,0029 / 1 000 (женщины)	[81]
	2001	0,0027 / 1 000 (мужчины)	[82]
Турция	2004	0,00015 / 1 000	[18]
Португалия	2004	0,0012 / 1 000	[108]
Италия	2006	0,32 / 1 000	[132]
Тайвань	2009	0,42 / 1 000	[59]
Австрия	2012	0,26 / 1 000	[89]
Венгрия	2012	0,075 / 1 000	[144]
США (штат Иллинойс)	2017	0,12 / 1 000	[28]
Испания	2017	0,00013 / 1 000	[31]
Япония	2018	0,0025 / 1 000	[121]

Массовые скрининговые исследования среди новорожденных указывают на большую распространенность БФ по сравнению с

распространенностью, выявленной в результате селективного скрининга. Так, в Италии проведение неонатального скрининга на наследственные болезни позволило получить объективные данные о частоте БФ, которая составила 1 случай на 3100 детей. У всех выявленных детей отмечалась сниженная активность фермента  $\alpha$ -гал А, и был впоследствии подтвержден патогенный нуклеотидный вариант в гене *GLA* [132]. Каскадная диагностика биологических родственников выявленных пациентов с более поздним началом БФ продемонстрировала недооцененность клинических проявлений БФ у мужчин. Соотношение пациентов с поздней манифестацией БФ и пациентов с классической формой составляет 7 случаев к 1. Частота новых случаев БФ, составляющая 1:2400 новорожденных мальчиков, выявлена при проведении неонатального скрининга в Тайване [59]. Большинство исследователей сходятся во мнении, что легкое, атипичное течение БФ с клиническими проявлениями поражения одного органа или одной системы превалирует по числу случаев по сравнению с классической формой БФ, поэтому не исключено, что многие случаи БФ, протекающие с поражением кожи, сосудов или почек, так и остаются не диагностированными. Мягкая клиническая картина и поздний возраст манифестации БФ обуславливает возникновение этических вопросов, в числе которых вопрос о проведении неонатального скрининга на БФ [64].

Сложность клинической диагностики БФ связана в первую очередь с осмотром пациентов врачами различных специальностей (неврологами, нефрологами, кардиологами, гастроэнтерологами, педиатрами), которые не оценивают фенотип пациентов комплексно ввиду недостаточности (отсутствия) необходимых знаний о редких болезнях вообще и БФ в частности. С развитием научного прогресса в области диагностики в медицине, а также с повышением осведомленности и настороженности врачей распространенность заболевания будет расти, поэтому данные о распространенности БФ будут отличаться от прежних. На увеличение числа случаев БФ в ряде стран (например, Японии, Ираке, Северной Индии,

Иордании, Таджикистане, Иране, Узбекистане) оказывают существенное влияние близкородственные браки. Кроме того, изолированное географическое положение, проявляющееся так называемым эффектом основателя, как в случае Исландии, либо традиционные предпочтения при заключении брака, как в случае евреев южной Италии, так же увеличивают число случаев БФ. Прогрессирование БФ находится в прямой зависимости от ранней постановки диагноза и своевременного начала патогенетической терапии, что имеет особую значимость в аспекте большого вклада заболевания в трудоспособности населения.

### **1.2.3. Этиология и патогенез болезни Фабри**

#### **1.2.3.1. Этиология БФ**

Первопричиной возникновения и развития БФ являются патогенные изменения нуклеотидной последовательности гена *GLA* (OMIM 300644), картированного на длинном плече X-хромосомы в области Xq22.1, который обладает протяженностью 1287 пар нуклеотидов и состоит из 7 экзонов, кодирующих 429 аминокислотных остатков фермента  $\alpha$ -гал А, отвечающего за катаболизм сфинголипидов [48]. В настоящее время в базе данных мутаций генов человека HGMD (The Human Gene Mutation Database) содержится более 1000 различных мутаций гена *GLA*, 758 из которых считаются патогенными вариантами, нарушающими размер, стабильность и свойства экспрессируемого белка. Около 70% всех мутаций составляют миссенс и нонсенс мутации, более 20% – являются небольшими вставками и делециями. Мутации сайтов сплайсинга составляют 5%, оставшиеся 5% всех описанных случаев БФ составляют протяженные делеции, вставки и перестройки [52, 57]. Для такого большого разнообразия различных мутаций гена *GLA* и его незначительной протяженности характерно отсутствие частых патогенных вариантов, наряду с уникальностью большинства мутаций для

единичных семей [22], что свойственно X-сцепленному наследованию, формальными признаками которого являются:

1) заболевание чаще проявляется у лиц мужского пола, унаследовавших ген, содержащий патогенный вариант;

2) заболевание наследуется от больного отца через его фенотипически (клинически) здоровых дочерей половине его внуков;

3) заболевание никогда не передается от отца к сыну. Больные мужчины имеют единственную X-хромосому, содержащую мутацию (гемизигота), которую передают только своим дочерям. Дочери пациентов мужского пола с БФ могут выглядеть клинически здоровыми («носители» мутантного гена) и могут передать «мутантную» X-хромосому половине своих потомков.

До недавнего времени считалось, что БФ наследуется по рецессивному типу, однако клинические проявления БФ у гетерозиготных женщин, обладающих патогенными вариантами гена *GLA*, заставили пересмотреть представления о типе наследования в пользу X-сцепленного. Это представляется важным, поскольку не все гетерозиготные женщины обладают атипичной картиной с поздней манифестацией и медленным прогрессированием. У некоторых из них развиваются жизнеугрожающие состояния, требующие медицинского вмешательства [142].

### **1.2.3.2. Патогенез болезни Фабри**

Болезнь Фабри развивается вследствие недостаточной активности фермента, расщепляющего гликофинголипиды, и сопровождается накоплением лизосомного глоботриаозилсфингозина (лизо-Гб3) и глоботриаолцерамида (Гб3) в почечных клубочках, почечных канальцах, кровеносных сосудах, в клетках периферической и центральной нервной системы, паренхиме внутренних органов. Накопление токсичных веществ обуславливает манифестацию классической формы БФ и развитие системного заболевания, сопровождающегося сердечно-сосудистыми и

цереброваскулярными нарушениями, прогрессирующей почечной недостаточностью, гипер- и гипогидрозом, акропарестезиями, ангиокератомами и другими аномалиями. Различные мутации гена *GLA* во многом определяют полиморфизм клинической симптоматики, то есть обуславливают развитие классической мультисистемой либо атипичной форм БФ. По всей видимости, концепция «континуума трех состояний» может быть с успехом использована для описания клинического полиморфизма БФ [4]. Известно, что гликофинголипиды синтезируются в костном мозге и печени, при этом транспорт глоботриаозилцерамида из гепацитов печени осуществляется липопротеинами высокой и низкой плотности посредством захвата липопротеиновыми рецепторами различных клеток. А значит повышенные уровни липопротеинов высокой и низкой плотности коррелируют с накоплением ГбЗ в различных органах и тканях организма.

$\alpha$ -гал А в свою очередь отщепляет терминальные остатки галактозы, превращая церамидтригексозиду в лактозилцерамид (рисунок 1).

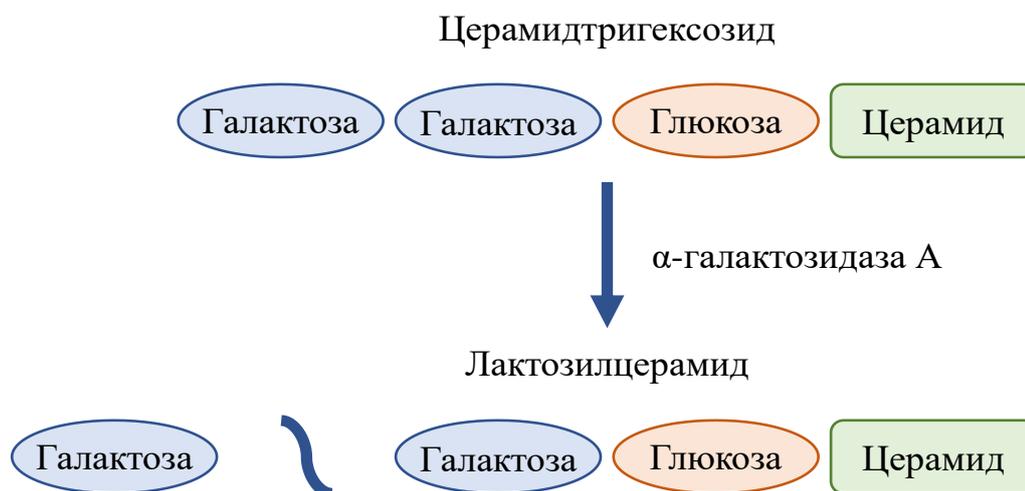


Рисунок 1 – Схема отщепления галактозы от церамидтригексозида под действием фермента [140].

#### 1.2.4. Клинические особенности болезни Фабри

Выраженный клинический полиморфизм БФ характерен не только для мужчин, женщины также демонстрируют вариабельность клинических проявлений. Кроме того, по-разному могут болеть и члены одной семьи, болезнь которых обусловлена одним и тем же патологическим вариантом гена *GLA*. Классическая форма БФ, манифестирующая в детском возрасте и отличающаяся поражением нескольких органов с различной степенью их вовлеченности и прогрессирующим течением, характерна для большинства пациентов с БФ. Атипичная форма БФ с манифестацией в позднем возрасте с преимущественным поражением одного органа или системы встречается реже и проявляется зачастую гипертрофической кардиомиопатией (ГКМП) и значительной остаточной ферментативной активностью  $\alpha$ -гал А [98].

##### 1.2.4.1. Неврологические симптомы

Клиническая картина БФ варьирует в зависимости от пола, возраста, патологического варианта в гене *GLA*, а также от формы (классическая или атипичная) заболевания. Нередко клиническую картину классической формы БФ определяют проявления острого нарушения мозгового кровообращения (ишемические/геморрагические инсульты, транзиторные ишемические атаки) и других симптомов поражения центральной нервной системы. Так, опытные специалисты могут предположить БФ у молодых пациентов неврологических отделений после перенесенного инсульта [130].

**Симптомы поражения периферической нервной системы.** По данным регистра FOS, нейропатическая боль в конечностях считается наиболее частым симптомом поражения периферической нервной системы как у мужчин (76%), так и у женщин (64%) в период дебюта БФ [90]. Болевые кризы проявляются приступообразной иррадиирующей колющей болью, распространяющейся в проксимальных отделах конечностей, зачастую в ладонях и стопах и, как правило, сопровождаются сменой погоды.

Нейропатические боли, которые длятся от одного часа до нескольких десятков часов, не купируются нестероидными анальгетиками. Патогенез болевых кризов обусловлен накоплением токсических субстратов в эндотелии сосудов, вызывающем дальнейшее повреждение нервных волокон [124].

**Симптомы поражения центральной нервной системы.** Сосудистые катастрофы считаются наиболее частой причиной летального исхода у пациентов с БФ. Геморрагические и ишемические инсульты, а также транзиторные ишемические атаки зачастую развиваются у пациентов с БФ до постановки диагноза. Данные регистра FOS указывают на высокую частоту развития инсульта у мужчин (5,6%) и женщин (4,3%). Считается, что 45 лет – это усредненный возраст наступления инсульта у пациентов с БФ [45]. МРТ картина головного мозга пациента с классической формой БФ характеризуется сосудистыми мальформациями, бессимптомным изменением белого вещества, лейкоарезом и поражением сосудов головного мозга [118].

Кроме того, около 80% пациентов с БФ жалуются на острые, сильные, приступообразные боли («кризы Фабри»), начинающиеся в конечностях и распространяющиеся на остальные части тела, и на хронические боли, проявляющиеся покалыванием и жжением и провоцируемые физической нагрузкой, стрессом, лихорадкой [29]. Пациенты с БФ отмечают повышенную утомляемость, общую слабость, постоянную и не проходящую усталость [45].

#### **1.2.4.2. Симптомы поражения сердечно-сосудистой системы**

Функциональная диагностика пациентов с БФ демонстрирует различные проявления поражения сердечно-сосудистой системы, в том числе утолщение стенок сердца, фиброз миокарда, гипертрофия левого желудочка

(ГЛЖ) сердца, желудочковые аритмии, изменения клапанов сердца, стенокардия, нарушения проводимости [6].

Глоботриаозилсфингозин накапливается в миоцитах и проводящей ткани, что приводит к утолщению стенок и клапанов сердца. Установлено, что патогенетическая терапия позволяет уменьшить толщину межжелудочковой перегородки и задней стенки левого желудочка, снижает тяжесть сердечно-сосудистой недостаточности на фоне снижения концентрации глоботриаозилсфингозина и других сфинголипидов, накапливающихся у пациентов с БФ [39, 49].

#### **1.2.4.3. Симптомы поражения мочевыделительной системы**

Микроальбуминурия и протеинурия – наиболее частые симптомы поражения почек у пациентов с БФ, манифестирующие, как правило, после первого десятилетия жизни. Сфинголипиды, накапливающиеся в интерстициальных и гломерулярных и клетках почечной ткани, а также в эндотелии почечных клубочков, со временем вызывают гломерулосклероз и постепенное снижение почечной функции, приводящие в некоторых случаях к терминальной стадии хронической почечной недостаточности (тХПН). Снижение функции почек сопровождается повышением уровня протеинурии как у мужчин, так и у женщин с БФ [44], а на четвертом-пятом десятилетии жизни на фоне атрофии почечных канальцев развивается склероз и фиброз почек. При отсутствии заместительной почечной терапии и трансплантации почек именно тХПН является основной причиной смерти пациентов с БФ, не получающих патогенетическое лечение [125].

#### **1.2.4.4. Симптомы поражения органа зрения**

Поражение органа зрения у пациентов с БФ характеризуется появлением на роговице глаза спицеобразного/завитого пятна, возникающего при образовании субкапсулярной катаракты (передней или задней) [103].

Кроме того, прогрессирование БФ сопровождается поражением сосудов сетчатки глаза, приводящим в некоторых случаях к потере зрения [131].

#### **1.2.4.5. Симптомы поражения органа слуха и вестибулярного аппарата**

Поражение органа слуха у пациентов с БФ зачастую характеризуется тиннитусом, нарастающей тугоухостью, приводящей в некоторых случаях к полной глухоте. Кроме того, многие пациенты с БФ предъявляют жалобы на головокружение и головную боль, отмечают нарушение походки и постепенную утрату функции вестибулярного аппарата [89, 125].

#### **1.2.4.6. Симптомы поражения кожи**

Ангиокератомы считаются наиболее частым проявлением кожного поражения у пациентов с БФ. Это сосудистые образования от 1 до 5 мм, незначительно выступающие над кожей, бордового, реже темно-синего цвета, располагающиеся на туловище, не бледнеющие при надавливании и увеличивающиеся с возрастом пациента. Помимо туловища ангиокератомы могут локализоваться на ладонях, локтях, коленях и губах.

Ангиокератомы диагностируются, как правило, в детском возрасте и в два раза чаще у мужчин, чем у женщин [146].

#### **1.2.4.7. Симптомы поражения желудочно-кишечного тракта**

Частые спастические боли после еды, тошнота, вздутие живота, диарея возникают у пациентов с БФ по причине накопления гликолипидов в ганглиях кишечника и сосудах брыжейки. Прогрессирование БФ сопровождается потерей веса и трудностью его набора вплоть до развития анорексии [55].

#### **1.2.4.8. Симптомы поражения органов дыхания**

Поражение органов дыхания у пациентов с БФ характеризуется хроническим бронхитом, одышкой, обструкцией дыхательных путей, свистящими хрипами. Функциональная диагностика демонстрирует низкий объем форсированного выдоха за единицу времени на фоне увеличивающейся функциональной остаточной емкости легких [83].

#### **1.2.4.9. Симптомы поражения костной системы**

Поражение костно-суставной системы регистрируется у 88% пациентов с БФ и проявляется остеопорозом или остеопенией, болевыми ощущениями в суставах, аваскулярными некрозами головки бедренной кости. Пациенты с БФ страдают от спонтанных переломов ввиду остеопении/остеопороза и от нарушения подвижности пальцев ввиду деформаций межфаланговых суставов [93]. Кроме того, у пациентов с БФ описаны случаи лицевого дисморфизма в виде малых аномалий развития черепно-лицевого скелета [32].

#### **1.2.4.10. Симптомы поражения других систем и органов**

Накопление сфинголипидов в потовых и слюнных железах приводит к снижению (гипогидрозу) либо полному отсутствию (ангидрозу) потоотделения, а также нарушениям слезо- и слюноотделения.

Накопление глоботриаозилцерамида и других сфинголипидов в яичках у мужчин с БФ приводит к развитию азооспермии и задержке полового развития [72]. Кроме того, описывается субклинический гипотиреоз при исследованиях эндокринологической направленности [50].

В анализах крови пациентов с БФ выявляют анемию и цитопению [101]. На фоне прогрессирования заболевания и нарастающей мультиорганной вовлеченности развиваются психиатрические проблемы, что

приводит к ограничению социализации (особенно подростков) и физической активности пациентов с БФ [115].

У большинства пациентов с БФ в первые годы жизни симптомы отсутствуют. В некоторых случаях манифестация классической формы БФ может носить врожденный характер, либо наступать в грудном возрасте. В других случаях первые клинические признаки болезни могут проявиться лишь на втором десятилетии жизни [113] (рисунок 2). Потеря трудоспособности, продолжительность жизни и прогноз находятся в прямой зависимости от ранней постановки диагноза и своевременности начала патогенетической терапии.

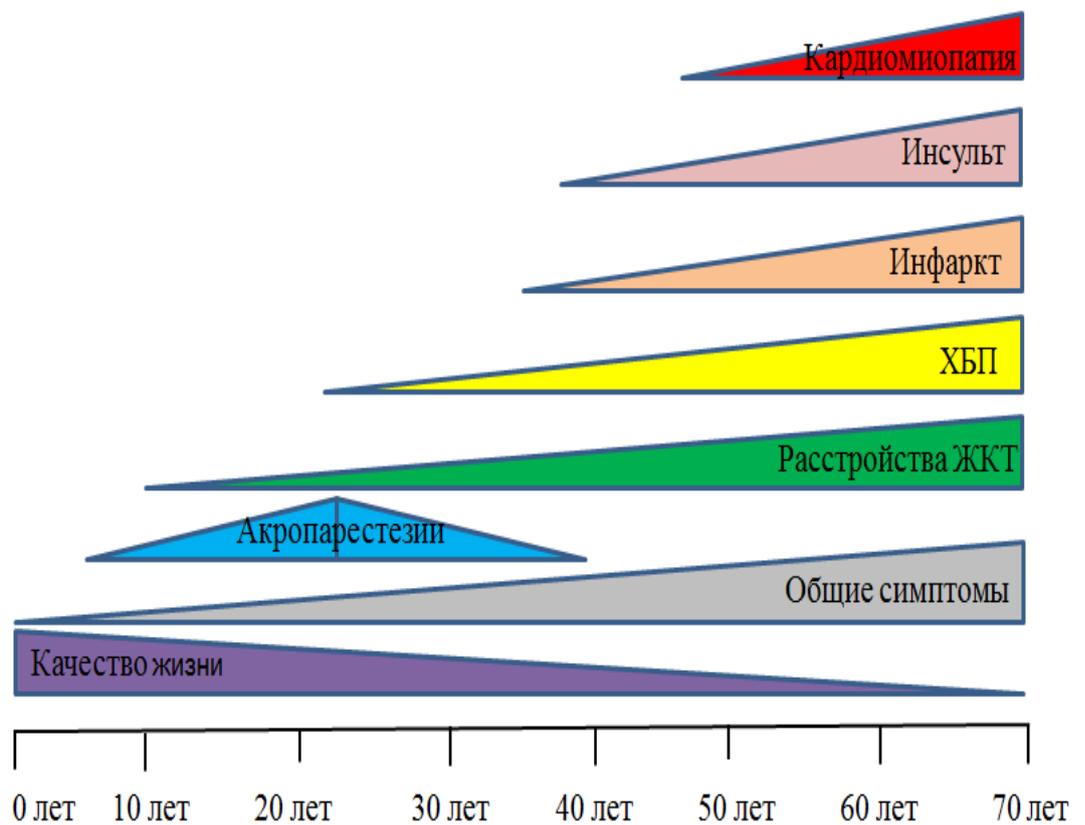


Рисунок 2 – Первые клинические проявления БФ и ее развитие на протяжении жизни [117]

### 1.2.5. Особенности диагностики болезни Фабри

Консилиум специалистов принимает решение о постановке диагноза БФ на основе комплекса данных, полученных в результате клинических, биохимических и молекулярно-генетических исследований. Биохимические исследования как правило включают измерение активности фермента  $\alpha$ -гал А и/или измерение концентрации субстрата лизо-ГБЗ. Для подтверждающей диагностики используют молекулярно-генетическое исследование кодирующих и прилегающих интронных областей гена *GLA*. «Золотым стандартом», включенным в стандарты оказания медицинской помощи в развитых странах, является двухэтапная диагностика БФ, состоящая из ферментативного исследования  $\alpha$ -гал А и поиска мутаций в гене *GLA* [8]. Высокая эффективность такого алгоритма диагностики БФ с использованием современных технологий тандемной масс-спектрометрии и секвенирования по Сэнгеру указывает на высокую достоверность полученных результатов.

#### 1.2.5.1. Биохимические методы диагностики болезни Фабри

В настоящее время к высокопроизводительным технологиям определения ферментативной активности относят технологию тандемной масс-спектрометрии, которая с успехом используется уже более 10 лет для определения активности  $\alpha$ -гал А в пятнах крови, высушенных на фильтре [1].

**Определение активности  $\alpha$ -галактозидазы А в плазме и лейкоцитах крови.** С 1973 года постановка диагноза БФ осуществляется на основании биохимических данных активности фермента  $\alpha$ -гал А. Фермент  $\alpha$ -галактозидаза А существует в двух изоформах  $\alpha$ -галактозидаза А и  $\alpha$ -галактозидаза В. У пациентов с БФ отмечается недостаточность только  $\alpha$ -гал А, который обладает большей активностью и термолабилен по сравнению с ферментом  $\alpha$ -гал В [34].

Классическим методом определения активности фермента  $\alpha$ -гал А в плазме крови является флуориметрический анализ, в котором в качестве синтетического субстрата используют 4-метилумбеллиферил-альфа-D-галактопиранозид. При этом при определении активности фермента в плазме крови к ферменту  $\alpha$ -гал А обязательно добавляют ингибитор фермента  $\alpha$ -гал В. Активность  $\alpha$ -гал В плазме крови составляет 20% от общей активности фермента  $\alpha$ -гал А, тогда как в лейкоцитах не превышает 10% от общей активности фермента  $\alpha$ -гал А. Измерение ферментативной активности  $\alpha$ -гал А считается эффективным методом первичной диагностики БФ у мужчин. Для женщин с подозрением на БФ измерение ферментативной активности нельзя считать надежным методом диагностики ввиду скошенной инактивации X-хромосомы, в результате которой женщины с клиническими проявления БФ могут демонстрировать нормальные значения ферментативной активности [120].

**Определение ферментативной активности  $\alpha$ -галактозидазы А в сухих пятнах крови посредством технологии тандемной масс-спектрометрии.** Это удобный и современный метод биохимической диагностики нескольких форм ЛБН, использующийся во многих странах мира благодаря высоким показателям чувствительности и специфичности [73]. Подтверждением этого являются исследования, доказывающие высокую эффективность диагностики БФ при помощи ферментативного анализа  $\alpha$ -гал А у мужчин, не имеющих клинических проявлений [104]. Женщины, страдающие БФ, могут демонстрировать нормальные значения ферментативной активности  $\alpha$ -гал А даже при наличии ярко выраженных клинических признаков заболевания, что связано с лайонизацией X-хромосомы [92], поэтому ферментативная диагностика БФ у женщин зачастую показывает ложноположительный результат. Образцы пятен крови, высушенные на фильтровальной бумаге, содержат меньше крови и более стабильны, чем цельная кровь. Пятна крови хорошо хранятся при +4°C несколько лет, при замораживании также сохраняют активность фермента,

как и при повышении температуры до +30°C [78]. При транспортировке пятна не требуют специальных условий, что особенно важно при длительной доставке из удаленных регионов и городов нашей страны [77].

### **Определение концентрации субстрата глоботриаозилсфингозина**

На настоящий момент в мировой лабораторной практике существует большое количество применяемых методов хроматографии для определения уровня метаболита лизо-Гб3: газо-жидкостная хроматография, которая применяется с 1967 года [138], высокоэффективная жидкостная хроматография применяется с 1989 года [87]. С 1994 года широко применяется метод масс-спектрометрии для обнаружения и идентификации лизо-Гб3 [114]. С 1999 года разработан метод тонкослойной хроматографии [21] и фермент-связывающей иммуносорбции [147].

Большое значение в диагностике БФ, в особенности у пациентов с малосимптомным течением болезни, имеет измерение концентрации субстрата лизо-Гб3 в сухих пятнах крови или в плазме крови. Лизо-Гб3 является более эффективным маркером по сравнению с  $\alpha$ -гал А, для диагностики БФ у пациентов обоих полов [23]. Кроме того, концентрацию лизо-Гб3 измеряют пациентам с установленным диагнозом для мониторинга ФЗТ [62]. Определение лизо-Гб3 в плазме крови методом масс-спектрометрии позволяет определить тяжесть заболевания [37]. В результате проведенного исследования на 124 пациентах с 2001 по 2010 в Германии центра Вюрцбурга, выявлено снижение уровня лизо-Гб3 (норма <2,7 нг/мл) у пациентов с атипичными разновидностями БФ. Высокий уровень лизо-Гб3 (норма <2,7 нг/мл) был определен у больных с классической формой БФ [100].

### **1.2.5.2. Молекулярно-генетическая диагностика болезни Фабри**

В современной лабораторной практике в качестве биологического материала для проведения молекулярно-генетического исследования наряду

с цельной кровью используются высушенные на фильтре пятна крови и клетки буккального эпителия. Наиболее значимым диагностическим методом для постановки окончательного диагноза любого генетического заболевания, в частности БФ, является молекулярно-генетическое исследование, позволяющее выявить патогенные нуклеотидные варианты. Этот метод редко применяют в качестве первичного теста при реализации проектов широкомасштабного скрининга БФ из-за его высокой себестоимости и трудоемкости, а также по причине отсутствия частых мутаций.

Молекулярно-генетические исследования БФ включают анализ гена *GLA* с охватом не только кодирующих, но и прилегающих интронных областей [102]. С конца 80-х годов прошлого века используется технология двунаправленного секвенирования предложенная в 1977 году английским биохимиком Фредериком Сэнгером. Так называемое секвенирование по Сэнгеру, технология получила название «метод обрыва цепи», позволяет прочитывать до 1000 пар нуклеотидов ДНК за один прогон и считается золотым стандартом молекулярно-генетического исследования большинства редких болезней, имеющих моногенную природу [53]. Несмотря на высокую точность, метод секвенирования по Сэнгеру не может считаться универсальным методом молекулярно-генетической диагностики, так как обладает невысокой производительностью. Современные технологии секвенирования нового поколения позволяют «прочитать» одновременно сразу несколько участков генома, это сотни миллиардов пар оснований, что является главным отличием от секвенирования по Сэнгеру. Еще 10 лет назад многие специалисты считали, что клиническая картина классической формы БФ наряду с бесспорными результатами биохимической диагностики этой формы у мужчин позволяет диагностировать БФ с высокой эффективностью. Иными словами, верификация БФ молекулярно-генетическими методами в таких случаях не требовалась. Однако в современные клинические рекомендации большинства развитых стран включено молекулярно-

генетическое исследование для верификации БФ как классической, так и атипичной формы [81].

### **Пренатальная и преимплантационная диагностика болезни Фабри**

Семьи с отягощенным анамнезом БФ направляются на пренатальную и преимплантационную диагностику (ППД). Ранее, на первом этапе диагностики, проводим определение пола плода, поскольку БФ считалась X-сцепленным рецессивным заболеванием, после чего проводили биохимические и молекулярно-генетические анализы. Биологическим материалом для исследования плода является биопсия клеток ворсин хориона, забор осуществляется на 9–12 неделях беременности. Также для исследования БФ используют и амниотическую жидкость, забор жидкости осуществляют на 17–19 неделях беременности. Снижение активности фермента  $\alpha$ -гал А определяется у плода и напрямую зависит от генотипа, поэтому у мужского пола снижение активности фермента будет наблюдаться всегда. Однако в случае известной мутации, как правило, сразу осуществляют ее поиск при помощи молекулярно-генетических методов исследования [35].

### **1.2.5.3. Скрининг болезни Фабри**

Программы массового неонатального и селективного скрининга БФ в большинстве случаев реализовывались с использованием технологии тандемной масс-спектрометрии, целью которой являлось измерение ферментативной активности  $\alpha$ -гал А в сухих пятнах крови.

**Неонатальный скрининг болезни Фабри.** Неонатальный скрининг всех новорожденных мальчиков проводился в Италии в течение двух лет с 2003 по 2005 гг., по результатам которого за этот период у 12 детей была обнаружена низкая ферментативная активность  $\alpha$ -гал А, что подтвердилось впоследствии во всех 12 случаях обнаружением мутации гена *GLA*. При этом в восьми случаях это были мутации гена *GLA*, описанные ранее при

классической и атипичной формах БФ, в четырех – новые варианты гена *GLA* *p.(Glu66Gly)*, *p.(Met51Ile)*, *p.(Ala73Val)*, *p.(Arg118Cys)*, не описанные ранее. Патогенность последних подтверждалась совпадением уровней избыточной экспрессии с уровнями, которые демонстрируют известные миссенс-мутации, вызывающие атипичную форму БФ. В результате проведенного исследования была установлена частота, составившая 1 случай БФ на 3100 новорожденных мальчиков, что в 12–15 раз превышало данные, полученные при селективном скрининге, когда частота составила 1:40 000 [91].

Программа неонатального скрининга, проведенного на Тайване с 2006 по 2008 год среди 171 977 (90 288 – мальчики, 81 689 – девочки) новорожденных, также включала измерение ферментативной активности в пятнах крови, высушенных на фильтре. По завершении 1-го этапа скрининга было выявлено 79 новорожденных со сниженной ферментативной активностью, на 2-м этапе скрининга было проведено молекулярно-генетическое исследование, в результате которого у 75 новорожденных были обнаружены мутации гена *GLA*. Частота БФ на Тайване при скрининге новорожденных мужчин составила 1 случай на 1250, что более чем в 2 раза превышает частоту БФ среди новорожденных в Италии [132]. Характерной мутацией для тайваньских новорожденных оказалась мутация *c.640-801G>A*, расположенная глубоко в интроне и вызывающая нарушение сплайсинга. Эта мутация была обнаружена у 59 новорожденных мальчиков со сниженной активностью фермента  $\alpha$ -гал А. Известно, что мутация *c.640-801G>A* обуславливает атипичную форму БФ. Впервые она была обнаружена у японских пациентов с кардиологическим вариантом БФ и поздним началом [61]. Исследования экспрессии и стабильности ферментов *in vitro* выявили, что ранее описанные мутации *p.(Asp93Asn)* и новые мутации *p.(Gly360Cys)* и *p.(Cys12\_Leu14del)* обуславливают очень низкую активность  $\alpha$ -гал А, что предсказывает классический фенотип. Две ранее описанные мутации, *c.196G>C*, *p.(Glu66Gln)* и *IVS4 + 919G>A* и четыре новые мутации, *c.137A>C*, *p.(His46Pro)*; *c.358C>G*, *p.(Leu120Val)*; *c.656T>C*, *p.(Ile219Thr)* и

*c.1067G>A, p.(Arg356Gln)*, обладали значительной остаточной активностью, что обуславливало атипичный фенотип [59].

В ходе неонатального скрининга, проведенного в 2012 году в Венгрии (г. Сегед), было исследовано 40 024 образца. При этом скринировались 4 ЛБН: болезнь Фабри, болезнь Гоше, болезнь Помпе и болезнь Ниманна-Пика, тип А и В. На 1-м этапе скрининга определялась активность четырех ферментов одновременно в сухих пятнах крови методом ТМС. На 2-м – проведенные исследования позволили обнаружить нуклеотидный вариант *c.427G>A, p.(Ala143Thr)* в гене *GLA* в гетерозиготном состоянии у трех новорожденных девочек. Частота выявленных случаев БФ при реализации проекта неонатального скрининга в Венгрии составила 1 случай на 13341 новорожденного [144].

**Селективный скрининг болезни Фабри.** Различные программы селективного скрининга с начала XXI века до настоящего времени существуют во многих странах мира, набирая все большую популярность. В рамках этих программ преимущественно используются технологии иммунофлуоресцентной диагностики и тандемной масс-спектрометрии, позволяющие выявлять сниженную активность фермента  $\alpha$ -гал А в сухих пятнах крови с последующей молекулярно-генетической диагностикой гена *GLA* при помощи технологии секвенирования по Сенгеру среди пациентов из групп высокого риска.

**Селективный скрининг болезни Фабри у пациентов, получающих лечение гемодиализом и перитонеальным диализом.** Одним из первых проектов селективного скрининга на БФ стало исследование, проведенное в 2002–2003 годах в Австрии среди 2480 (1516 мужчин, 964 женщины, средний возраст более 60 лет) возрастных пациентов. В результате скрининга у 32 женщин и 53 мужчин было обнаружено снижение активности фермента  $\alpha$ -гал А. У 4 пациентов мужского пола подтвержден молекулярно-генетическим методом диагноз БФ. Была выявлена одна новая, ранее не описанная

миссенс-мутация БФ в гене *GLA* – *p.(Ile239Thr)*. При дальнейшем семейном скрининге этого пациента, БФ подтвердилась еще у трех родственников [70].

Позднее похожий проект селективного скрининга среди 3370 (1521 мужчина и 1849 женщин) диализных пациентов был реализован в Чехии в 2007 году. В результате скрининга снижение активности фермента  $\alpha$ -гал А было обнаружено у 117 человек. Проведенная молекулярно-генетическая диагностика подтвердила БФ у четырех мужчин и одной женщины (ее ферментативная активность была снижена на 30% по сравнению с нормальной). Дальнейший сегрегационный анализ в семьях выявленных пациентов позволил обнаружить еще 10 случаев БФ [94].

Селективный скрининг БФ среди 558 пациентов мужского пола, находившихся на гемодиализе, был проведен в 2008 году в Бразилии. Сниженная ферментативная активность была обнаружена лишь у двух пациентов. Один из них, 46-летний пациент, страдал от акропарестезии, помутнения роговицы, гипогидроза и ангиокератом, что укладывается в рамки классического течения БФ, тогда как у второго, 42-летнего пациента, отмечалось развитие гипертрофии левого желудочка помимо прогрессирующей патологии почек, характерной для всех скринируемых пациентов [112].

Еще одним примером селективного скрининга БФ у пациентов гемодиализных центров является исследование, проведенное среди 911 испанских пациентов (543 мужчины и 368 женщин), средний возраст которых составил 66,2 года для женщин и 66,9 года для мужчин. Ферментативная диагностика сухих пятен крови выявила низкую активность фермента у 30 мужчин и 25 женщин. Патогенные изменения гена *GLA* были обнаружены у 7 неродственных пациентов (4 мужчины и 3 женщины). Были идентифицированы 2 новые мутации: *p.(Gly346AlafsX347)* и *p.(Val199GlyfsX203)*. Ранее описанная мутация *p.(Arg118Cys)* была выявлена у 4 пациентов. Вариант *p.(Asp313Tyr)*, который считают аллелем псевдодефицита, был обнаружен у 2 пациентов [105].

Селективный скрининг БФ среди 1453 диализных пациентов был проведен в 2010–2011 гг. в Японии (префектура Ниигата). На 1-м этапе исследования всем пациентам измерялась концентрация биомаркера лизо-Гб3 (у трех пациентов она оказалась выше нормальных значений). У одного из пациентов с повышенной концентрацией лизо-Гб3 была обнаружена мутация *p.(Tyr173\*)*, у оставшихся двух – псевдодефицитная мутация *p.(Glu66Gln)*. Пациенту с мутацией *p.(Tyr173\*)* назначена ФЗТ. Последующий скрининг его семьи выявил ту же мутацию у его старшей сестры и ее детей [54].

### ***Селективный скрининг в Российской Федерации***

Первые исследования были проведены с 1982 по 2013 гг., среди 612 пациентов (560 мужчин и 52 женщины) с подозрением на классическую форму БФ, возраст группы составил от 5 до 86 лет, пациенты из отделений нефрологии и гемодиализа, психоневрологии и кардиологии. В исследовании определяли активность общей  $\alpha$ -галактозидазы ( $\alpha$ -гал) и  $\alpha$ -галактозидазы А ( $\alpha$ -гал А) в пятнах крови. В результате исследования было выявлено снижение активности фермента у 3 пробандов (2 мужчины и 1 женщины), которым был проведен молекулярно-генетический анализ гена *GLA*. При проведении обследования родственников одного из пробандов было выявлено еще 3 пациента с болезнью Фабри. В результате скрининга предложен алгоритм диагностики в зависимости от пола пациента на основании клинической картины и данных активности общей  $\alpha$ -галактозидазы ( $\alpha$ -гал) и  $\alpha$ -галактозидазы А ( $\alpha$ -гал А) в пятнах крови, и молекулярно-генетического анализа гена *GLA* [3].

Российская программа скрининга БФ, реализованная с 2014 по 2016 гг. среди 5572 (3551 мужчина и 2021 женщина) пациентов отделений диализа, позволила подтвердить классическую форму БФ у 20 (19 мужчин и 1 женщина, средний возраст 43 года) пациентов со сниженной ферментативной активностью путем измерения концентрации лизо-Гб3 и секвенирования кодирующих и прилегающих интронных областей гена *GLA*. Лизо-Гб3

измеряли методом ТМС в сухих пятнах крови в лабораториях Германии (Centogene AG) и в лаборатории Вены, Австрия (Life Science GmbH). Пороговые значения концентрации лизо-Гб3 были  $\leq 1,8$  нг/мл и 0,0–3,5 нг/мл соответственно. 17 различных мутаций в гене *GLA* были идентифицированы у 20 пациентов, в том числе 12 миссенс-мутаций и 5 нонсенс мутаций. Согласно компьютерному анализу (Alamut® Visual), обнаружено 5 новых мутаций (*c.400T>G*, *c.786delG*, *c.508G>T*, *c.1197G>A*, *c.166T>A*), которые были патогенными. Все 5 пациентов соответствовали критериям диагноза болезни Фабри. Одна миссенс-мутация *c.161T>C* была обнаружена у 3 пациентов, включая 2 братьев, и одна нонсенс мутация *c.658C>T* присутствовала у 2 пациентов [88]. Мутация *c.786delG* приводит к преждевременной терминации трансляции, сдвигая рамку считывания. Один пациент с 13-летним анамнезом заболевания почек, с прогрессирующим снижением функции почек, гемодиализ в течение последних 6 месяцев и без классических проявлений БФ, имел позднюю мутацию, характерную для фенотипа с преимущественным поражением сердца *p.(Asn215Ser)*. Он показал повышенный уровень лизо-Гб3, снижение активности  $\alpha$ -гал А, легкую гипертрофию левого желудочка (13 мм) и поражения белого вещества на МРТ. Женщина была с нейропатической болью и гипогидрозом в анамнезе, нонсенс-мутацией в гене *GLA c.658C>T*, умеренно сниженной активностью фермента  $\alpha$ -гал А и повышенным уровнем лизо-Гб3 в высохшем пятне крови [95].

Проводимый селективный скрининг в 2020 гг. классической формы БФ были включены 4077 пациентов (1623 мужчины и 2454 женщины) с ХПН из 5 диализных центров. В результате исследования были выявлены 7 пациентов с БФ (6 мужчин и 1 женщина). Для выявления пациентов БФ применяли определение концентрации глоботриаозилсфингозина в сухих пятнах крови. В данном исследовании распространенность по данной выборке среди пациентов отделений гемодиализа составила 0,17% [60].

**Селективный скрининг болезни Фабри у пациентов с цереброваскулярными заболеваниями.** Селективный скрининг БФ среди 1000 (500 мужчин и 500 женщин) взрослых пациентов обоих полов с цереброваскулярными проявлениями (ОНМК, внутричерепные кровоизлияния, ТИА, долихоэктазии) был проведен в 2010 г. в Бельгии. На 1-м этапе скрининга всем пациентам мужского пола измеряли ферментативную активность в сухих пятнах крови, тогда как пациентам женского пола сразу проводили секвенирование кодирующих областей гена *GLA*, в результате чего БФ была выявлена у 10 пациентов (2 мужчины, 8 женщин) [27].

**Селективный скрининг болезни Фабри у пациентов с гипертрофической кардиомиопатией.** Гипертрофическая кардиомиопатия – это генетическое заболевание миокарда, характеризующееся гипертрофией левого желудочка сердца, необъяснимой вторичными причинами и характеризующееся значительной неоднородностью морфологии, клинических проявлений, генетической этиологии и исходов. У большинства взрослых пациентов ГКМП имеет относительно доброкачественное течение, однако у подростков и молодых людей ГКМП является частой причиной внезапной сердечной смерти. Такого рода осложнения можно предотвратить путем имплантации кардиовертера-дефибриллятора пациентам из групп высокого риска. К настоящему времени известно более 30 генов, мутации которых вызывают ГКМП. Приблизительно 50% семейных случаев ГКМП обусловлены мутациями саркомерных генов *MYH7* и *MYBPC3*, кодирующих тяжелую цепь миозина и миозин-связывающий белок С, соответственно, тогда как почти у 40% пациентов с ГКМП мутации не обнаруживаются [84]. По мнению одних ученых это связано с тем, что причинные гены еще предстоит идентифицировать, тогда как другие специалисты считают такие случаи немэнделирующими случаями ГКМП с более благоприятным прогнозом. Несмотря на то, что выявление новых генов и механизмов патогенеза ГКМП остается немаловажным, переоценка менделевских генетических ассоциаций при ГКМП утверждает, что текущее клиническое

генетическое тестирование должно быть ограничено небольшим числом генов с хорошо интерпретируемыми результатами [86]. Кроме того, необходимо помнить о том, что мутации в генах, ответственных за некоторые болезни накопления также вызывают фенотип ГКМП, являясь, так называемыми фенокопиями. Для классической формы БФ характерно мультисистемное поражение, при которой гипертрофия левого желудочка сердца развивается примерно у 80% мужчин и у 20-33% женщин [62]. У атипичной формы БФ, характерно поражение одной из систем организма. При атипичной форме БФ развивается ГЛЖ, имитирующая саркомерную ГКМП [40].

Селективный скрининг БФ среди 30 пациентов из Эдмонта (Канада) и 236 пациентов из Гонконга (Китайская Народная Республика) обоих полов с гипертрофией левого желудочка (от умеренной до тяжелой степени) был проведен в 2020 г. Обеим группам пациентов (266 человек) была проведена ферментативная диагностика с использованием сухих пятен крови, в результате чего удалось выявить 5 неродственных пациентов мужского пола со сниженной активностью  $\alpha$ -гал А. Все выявленные пациенты были из Гонконга и обладали интронным патогенным вариантом *c.640-801G>A* гена *GLA*. В Эдмонтонской когорте была обнаружена женщина БФ с ГКМП, у которой активность фермента  $\alpha$ -гал А была в норме. Результаты ЭКГ показали отчетливую ГЛЖ на основе критериев напряжения с нормальным интервалом PR. Распространенность БФ среди пациентов с ГЛЖ [41], уже неоднократно оценивали иностранные коллеги, публикуя данные, различающиеся в диапазоне от 0% до 12% в зависимости от критериев отбора и методологии диагностики. Доэни с коллегами повторно проанализировали все скрининговые исследования, опубликованные с 1995 по 2017 годы, суммировав данные и предоставив более достоверные оценки распространенности ранее нераспознанной БФ в когортах кардиологических больных на уровне 0,9% как у мужчин, так и у женщин [36]. Скрининговые исследования проводилось у взрослых пациентов мужского пола, ввиду

ложноотрицательных значений ферментативной диагностики БФ у женщин [52].

В последние годы в качестве анализа для первичного скрининга БФ стали использовать биомаркер лизо-Гб3 [122], накапливаемый в организме пациентов с БФ, при этом не у всех пациентов с повышенными уровнями этого биомаркера выявлялись мутации [85], несмотря на доказанную эффективность его использования для определения клинической значимости неописанных вариантов [100]. Наиболее чувствительным методом диагностики БФ у женщин остается скрининг при помощи секвенирования по Сэнгеру всех кодирующих и прилегающих интронных областей гена *GLA* [99].

Современные технологии ВПС зачастую используются в клинической практике для одновременного анализа нескольких генов, мутации которых вызывают болезни, объединенные схожим фенотипом, к примеру, для диагностики болезни Помпе и других болезней с первичным поражением мышц [19]. Именно эта технология была выбрана нами для проведения селективного скрининга атипичной формы БФ с поздним началом, среди взрослых пациентов обоих полов.

Проведение скрининговых программ для пациентов с ГКМП и выявления у них БФ может существенно облегчить состояния пациентов путем применения ферментозаместительной терапии либо терапии шаперонами [129].

## **1.2.6. Общие принципы лечения болезни Фабри**

### **1.2.6.1. Симптоматическое лечение болезни Фабри**

Симптоматическая терапия широко применяется при лечении детей и взрослых с БФ при различных состояниях (таблица 3).

Таблица 3 – Симптоматическое лечение при БФ

Проявления БФ	Назначаемые препараты	Комментарий
Болевой синдром	НПВС, антиконвульсанты, анальгетики	При назначении препаратов учитывают силу болевого синдрома, наличие хронической боли, а также степень поражения тканей, органов и/или систем вовремя так называемых кризов Фабри.
Цереброваскулярные и сердечно-сосудистые осложнения	Антитромбоцитарные и антиаритмические препараты, антикоагулянты	Препаратами снижают выраженность проявлений.
Заболевания ЖКТ	Препараты, стимулирующие моторику, противорвотные (при тошноте)	Пациентам увеличивают частоту приемов пищи, уменьшают объем порций, диетами уменьшают содержание жира в пище. Препаратами стимулируют моторику, снижают выраженность тошноты.
Поражение почек	Ингибиторы АПФ	На ранних стадиях ХПН назначают низкобелковую/ низко натриевую диету. Пациентам с терминальной стадией ХПН назначают гемодиализ или трансплантацию почек.
Ангиокератомы		Ангиокератомы удаляют различными способами: лазерная терапия, электрокоагуляция, крио деструкция, криотерапия, радиоволновое удаление, разрушение кислотами, хирургическое вмешательство и пр.
Нарушения слуха	Противорвотные (при тошноте и головокружении)	Кохлеовестибулярные проявления корректируются при помощи слуховых аппаратов и кохлеарных имплантатов (при полной потере слуха).
Нарушение функции эндокринной системы	Гормональные препараты	Назначают заместительную гормональную терапию.
Разрушение костной системы	Бисфосфонаты, витамин Д	Бисфосфонаты используют для лечения остеопороза, витамин Д – для восстановления минерального обмена.
Психоэмоциональные расстройства	Психотропные препараты, витамины группы В	Лекарственная коррекция состояния, консультации психологов и психотерапевтов. Для профилактики астении и повышенной нервозности назначают прием витаминов группы В.

### 1.2.6.2. Ферментозаместительная терапия при болезни Фабри

Клиническая эффективность и безопасность использования патогенетического лечения БФ доказаны в 2001 году, когда были лицензированы 2 препарата для терапии БФ: агалсидаза альфа (Replagal<sup>®</sup>, Cambridge, MA, USA), получаемая из фибробластов кожи человека, и агалсидаза бета (Fabrazym<sup>®</sup>, MA, USA), получаемая из яичников китайских хомячков [119].

Продолжительность жизни пациента с БФ существенно сокращается без симптоматического лечения и ферментозаместительной терапии. Пациенты с БФ, как правило, умирают на четвертом-пятом десятилетии жизни от сердечно-сосудистых или цереброваскулярных заболеваний, или по причине развития терминальной стадии хронической почечной недостаточности.

Эффективность использования ФЗТ подтверждается замедлением прогрессирования заболевания [65]. Применение ФЗТ у пациентов с БФ приводит к снижению патологических концентраций сфинголипидов глоботриаозилсфингозина и гликосфинголипида в лизосомах клеток и, как следствие, в органах и тканях, к нормализации работы внутренних органов [109]. ФЗТ позволяет снизить болевой синдром и увеличить время между болевыми кризами, уменьшить проявление симптомов болезни желудочно-кишечного тракта и костно-мышечных болей, снизить выраженные клинические проявления гипертермического синдрома, нормализовать переносимость физической нагрузки и тепла/жары, то есть улучшить качество жизни пациентов [47].

Ферментозаместительная терапия, включающая препараты агалсидаза альфа или агалсидаза бета, снижает выраженность многих клинических симптомов, отодвигает наступление диализной стадии почечной недостаточности, сердечно-сосудистой недостаточности, цереброваскулярных нарушений [58]. Сегодня при своевременно и

правильно назначенном патогенетическом лечении можно не только существенно улучшить состояние пациента, но значительно продлить его жизнь [58, 98].

В настоящий момент разрабатываются препараты второго поколения (растительного происхождения) для ФЗТ болезни Фабри. Так, препарат пегунигалсидаза альфа (Protalix Biotherapeutics, Израиль), содержащий новую улучшенную формулу фермента  $\alpha$ -гал А, в меньшей степени вызывает образование антител и характеризуется улучшенным распределением фермента в организме. Его преимуществами по сравнению с используемыми для ФЗТ болезни Фабри препаратами агалсидаза альфа и агалсидаза бета являются достаточно длительный период полувыведения из организма пациента (длительный период действия) и активное поглощение тканями сердца и почек, в связи с чем частота инъекций препарата может быть сокращена до двух или одного раза в месяц [127].

### **1.2.6.3. Субстратредуцирующая терапия при болезни Фабри**

В качестве субстратредуцирующей терапии (СРТ) перорально применяют иминосакхара, которые ингибируют синтез гликофинголипидов, а также приводят к стойкому повышению активности  $\alpha$ -гал А и способствуют снижению накопления ГбЗ в клетках и органах. Эффективно подобные препараты применяются при лечении болезни Гоше (наследственная ферментопатия, относится к ЛБН). Сегодня на предмет эффективности, переносимости и безопасности при лечении БФ исследуются препараты венглустат и луцерастат [106].

### **1.2.6.4. Фармакологическая шаперонотерапия при болезни Фабри**

В случае болезни Фабри под фармакологической шаперонотерапией (ФШ) понимается терапия небольшими молекулами (фармакоперонами,

действующими, как белковый шаперон), основанная на стабилизации некоторых мутантных форм  $\alpha$ -гал А с целью их успешного функционирования в лизосомах [61]. Стабилизация конформации дефектного фермента происходит при взаимодействии с его каталитическим центром в эндоплазматическом ретикулуме с возможностью дальнейшей транспортировки в лизосомы. Новым препаратом для лечения БФ является мигиластат, пероральный ингибитор  $\alpha$ -гал А (его назначают пациентам с достаточно высокой остаточной ферментативной активностью). В ряде проведенных исследований показана эффективность применения этого препарата у пациентов, страдающих БФ, с сердечно-сосудистыми проявлениями в целях предотвращения сердечно-сосудистых осложнений [107]. Препарат мигиластат показан к применению лишь тем взрослым пациентам с БФ, которые имеют в геноме такие мутации, действие которых можно корректировать путем связывания с активным центром экспрессируемого белка. Препарат мигиластат успешно применяется во многих странах мира, в Российской Федерации препарат не зарегистрирован [129].

#### **1.2.6.5. Генная терапия при болезни Фабри**

В последние годы активно разрабатываются препараты, представляющие собой активные копии дефектных генов, вводимые в определенные клетки организма человека с целью количественной и качественной компенсации функциональных белков. Также учеными рассматривается возможность комбинации ФЗТ и ФШ в целях поиска решения проблемы разработки препаратов, проходящих через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) в ткани центральной нервной системы для влияния на неврологические симптомы БФ. В настоящий момент генная терапия БФ находится на стадии долгосрочных исследований: проводятся фундаментальные научные исследования кардиотропных векторов, которые обладают низкой иммуногенностью в сравнении с аденовирусными

конструкциями и лучшим проникновением в миокард. Данные исследования [33] демонстрируют, что человеческая мРНК фермента  $\alpha$ -гал А, упакованная в липидные наночастицы, введенная в организм лабораторных животных, приводит к повышению активности фермента в печени, сердце и почках.

Течение заболевания и его исход находятся в прямой зависимости от возраста пациента при постановке диагноза, своевременности диагностики и начала лечения: чем раньше поставлен диагноз и начата эффективная патогенетическая терапия, тем легче протекает болезнь и благоприятнее прогноз, тем больше вероятность снизить риск инвалидизации пациентов с БФ.

При своевременно начатой пожизненной ферментозаместительной терапии продолжительность жизни пациентов с диагнозом БФ увеличивается и нередко достигает общепопуляционной. Повышается также и качество их жизни, что позволяет пациентам вести трудовую деятельность [141].

### **1.2.7. Генотип-фенотипические связи болезни Фабри**

Установление генетической причины БФ ставит задачу по обнаружению и описанию связи каждой конкретной мутации с клиническими проявлениями болезни у отдельных пациентов для прогнозирования течения болезни у других пациентов с тем же патогенным вариантом. Ощутимых корреляций с достаточной степенью достоверности описано не так много. Вероятно, это связано с низким числом мутаций, повторяющихся в различных семьях, а также с высоким полиморфизмом клинической симптоматики даже в рамках одной семьи [68]. Большинство взрослых пациентов имеют клиническую картину, которая наблюдается в общей популяции: сердечно-сосудистая патология, боль в конечностях, расстройство ЖКТ, это делает проблематичным связь фенотипа с конкретной мутацией. При нарушении функций клеток при БФ многие симптомы, развиваясь и прогрессируя, являются вторичными симптомами БФ [116].

### 1.3. Заключение

Следует отметить, что высокий клинический полиморфизм пациентов с БФ и отсутствие универсального биомаркера БФ, который позволяет выявить наличие или отсутствие заболевания у любого пациента с БФ, затрудняют разработку диагностических алгоритмов рассматриваемого заболевания. При этом, даже использование нескольких анализов в диагностическом алгоритме может привести к сомнительному результату в связи с высокой вероятностью появления ложноположительных и ложноотрицательных тестов и, как следствие, к поздней диагностике и позднему назначению патогенетической терапии, что, в свою очередь, может повлечь за собой необратимые изменения органов и тканей пациентов с БФ и ухудшение прогноза.

Вопросы оптимизации диагностического алгоритма и установления генотип-фенотипических взаимосвязей у российских пациентов с классической и атипичной формой БФ остаются открытыми, их актуальность не вызывает сомнений ввиду наличия препаратов, рекомендованных для патогенетического лечения и доказавших свою эффективность.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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.).

### 2.1. Этический контроль

Проведение исследования было одобрено локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет) протокол №10-19 от 17.07.2019 г., представитель – Николенко В.Н). Пациентами, возраст которых превышал 14 лет, а также представителями пациентов, возраст которых не достигал 14 лет, были подписаны информированные согласия на обработку персональных данных.

## 2.2. Дизайн исследования

Исследование включало шесть основных этапов (рисунок 3).

**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, передавался в лабораторию молекулярной генетики и медицинской геномики Центра фундаментальных исследований в педиатрии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

**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  $\alpha$ -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.

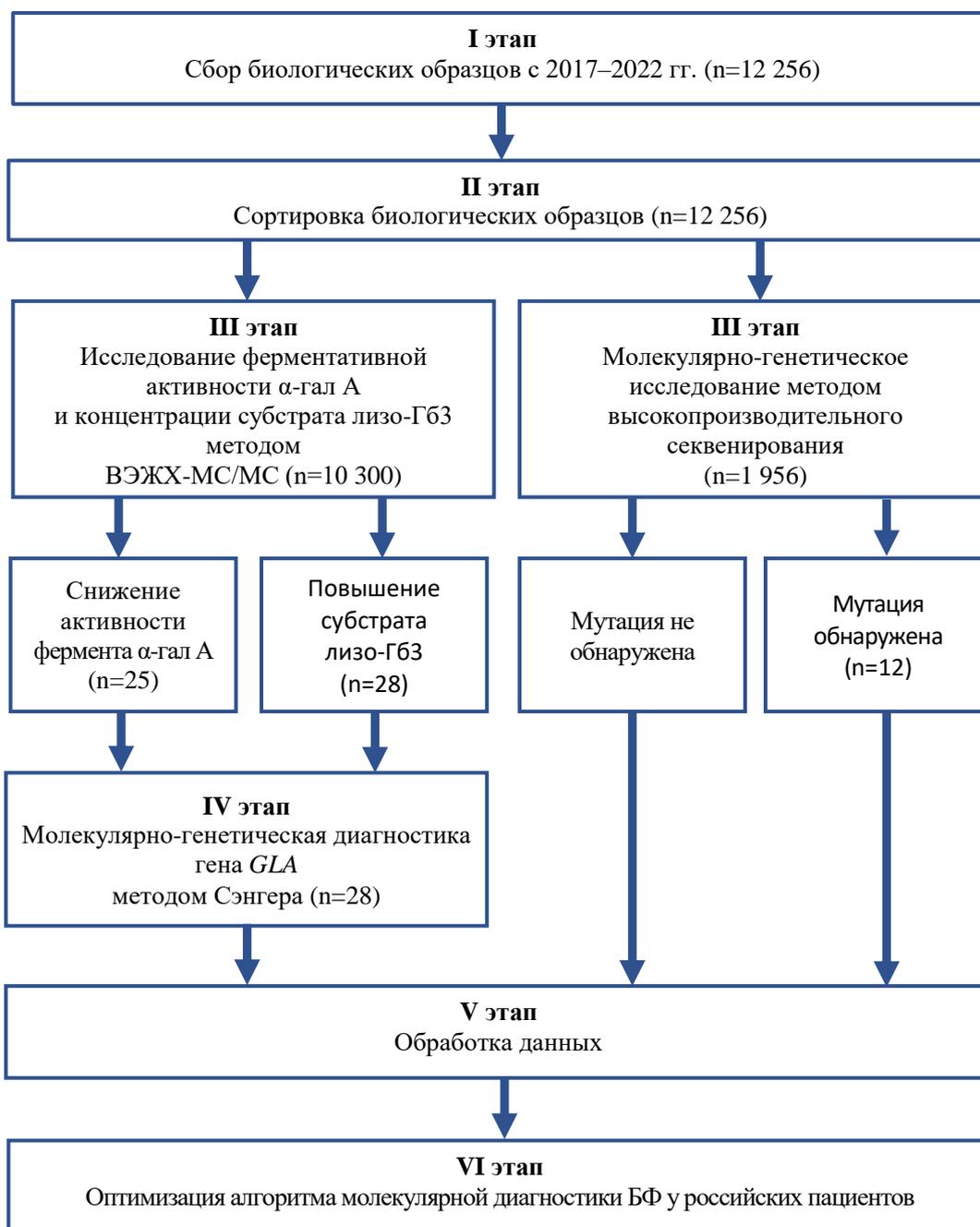


Рисунок 3 – Дизайн ретроспективно-проспективное нерандомизированное исследование

**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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -гал А и концентрации субстрата лизо-Гб3 в выборке российских пациентов с БФ с помощью статистических программ.

**Шестой этап.** Оптимизация алгоритма лабораторной диагностики БФ у российских пациентов.

### **2.3. Материал для исследования**

Для проведения селективного скрининга БФ в период с 2017 по 2022 год были собраны 12256 образцов крови пациентов, из которых 10300 образцов пятен крови пациентов из государственных и частных медицинских учреждений 8 федеральных округов Российской Федерации, направленных для исключения классической формы БФ; биоматериал 1956 пациентов поступил в рамках программы скрининга на атипичную форму БФ, проявляющуюся гипертрофической кардиомиопатией.

В коллекции 10300 образцов биологического материала, собранных для селективного скрининга классической формы БФ, соотношение мужского и женского пола составило соответственно 8:1. Неравномерность распределения по полу обусловлена типом наследования заболевания, поздним началом и неочевидным проявлением клинической картины заболевания у женщин. Средний возраст на момент проведения исследования

у мужчин составил 35,7 года, а у женщин – 42,5 года. В группе 1956 пациентов с ГКМП соотношение полов мужского к женскому составило 2:1. Средний возраст на момент проведения исследования в этой группе составил 54,4 года. Селективный скрининг при классической форме БФ проводился в соответствии со следующими критериями отбора: ангиокератомы, акропарестезии, поражение почек, (вплоть до тяжелой почечной недостаточности), гипогидроз, расстройства ЖКТ, гипертрофическая кардиомиопатия, ранние инсульты. При атипичной форме БФ с клиническими проявлениями ГКМП на первом этапе скрининга 1956 пациентам было проведено молекулярно-генетическое исследование методом высокопроизводительным секвенированием целевых областей.

Биологический материал поступал из различных лечебно-профилактических медицинских учреждений, включая диализные центры, кардиологические и неврологические отделения, медико-генетические консультации. Образцы пятен крови (капиллярной или венозной) наносились на диски фильтровальной бумаги Whatman 903 (Whatman, США). Размер бумажных полосок  $150 \times 70$  мм, диаметр пятен 15 мм, количество дисков 5. Диски гомогенно пропитываются кровью с обеих сторон (объем крови 0,08–0,1 мл вмещает одно пятно), сохнут не менее 3 часов при комнатной температуре  $20\text{--}25^\circ\text{C}$  без попадания прямых солнечных лучей. Все необходимые исследования проводились в течение 14 рабочих дней с момента поступления биологического материала в лабораторию. До и после проведения исследования образцы хранили при  $+4^\circ\text{C}$  в холодильнике.

Для определения значений отрезных точек и вычисления референсных интервалов показателей  $\alpha$ -гал А и лизо-Гб3 использовали группу из 100 человек в возрасте от 10 до 60 лет без клинических проявлений БФ и не имеющих родственников с БФ или другими ЛБН. Соотношение в группе мужского пола и женского пола составило 3:1 соответственно. Средний возраст в группе составил  $38,34 \pm 17,06$  лет, медиана активности фермента  $\alpha$ -

гал А составила 6,23 мкмоль/литр/час и биомаркера лизо-Гб3 0,67 нг/мл. Характеристика пациентов контрольной группы представлена в таблице 13.

Для валидации метода ферментативной активности и определения концентрации биомаркера диагностики БФ использовали в качестве внутреннего контроля у пациентов с БФ с ранее измеренной низкой активностью  $\alpha$ -гал А и высокой концентрацией лизо-Гб3 в сухих пятнах крови. Использовали флуориметрический метод в лаборатории иммунологии и вирусологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей», до начала ФЗТ. Диагноз БФ у пациентов был подтвержден методом секвенирования по Сэнгеру. Число пациентов с диагнозом БФ составило 10 человек. Далее этим пациентам измеряли концентрацию биомаркера лизо-Гб3 (медиана 15,01 нг/мл) и активность  $\alpha$ -гал А (0,88 мкмоль/литр/час) методом ТМС. Диапазоны значений активности  $\alpha$ -гал А и концентрации биомаркера лизо-Гб3 позволили найти отрезные точки для проведения исследования. Отрезная точка для активности  $\alpha$ -гал А составила 1,89 мкмоль/л/ч. А отрезная точка для концентрации биомаркера лизо-Гб3 составила 2,10 нг/мл. Данные представлены в виде коробчатых графиков (рисунок 4 и 5). Полученные результаты согласовывались с данными зарубежных исследований [17].

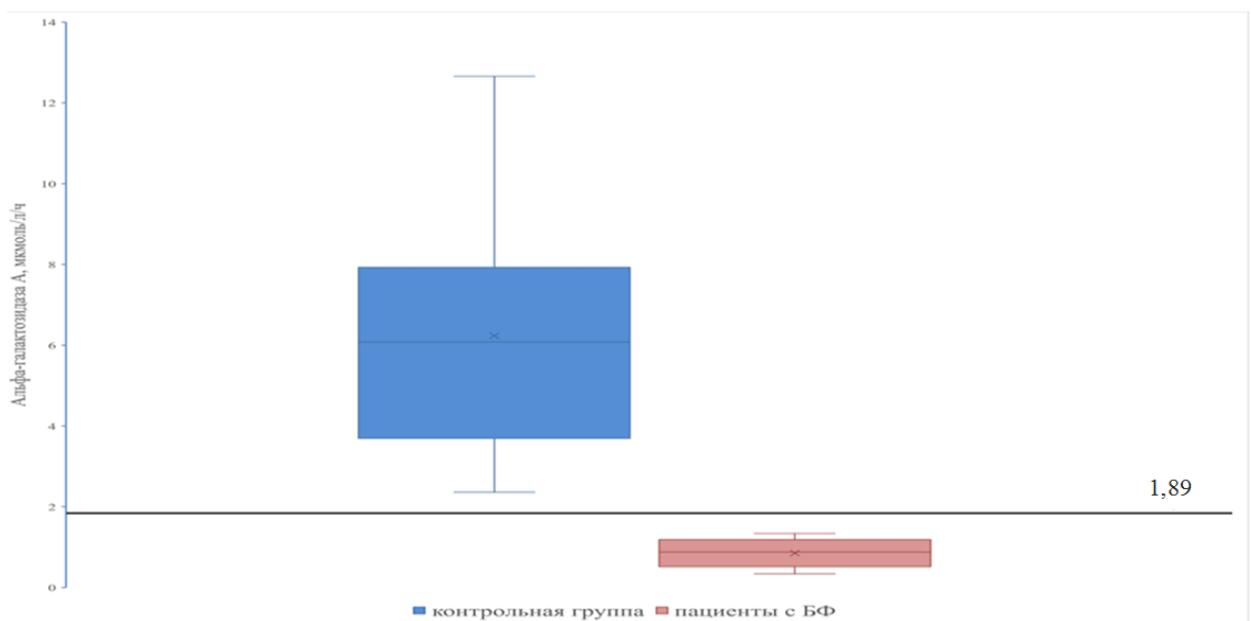


Рисунок 4 – Показатели активности  $\alpha$ -галактозидазы А в пятнах крови, высушенной на фильтровальной бумаге в контрольной группе и в группе пациентов с БФ.

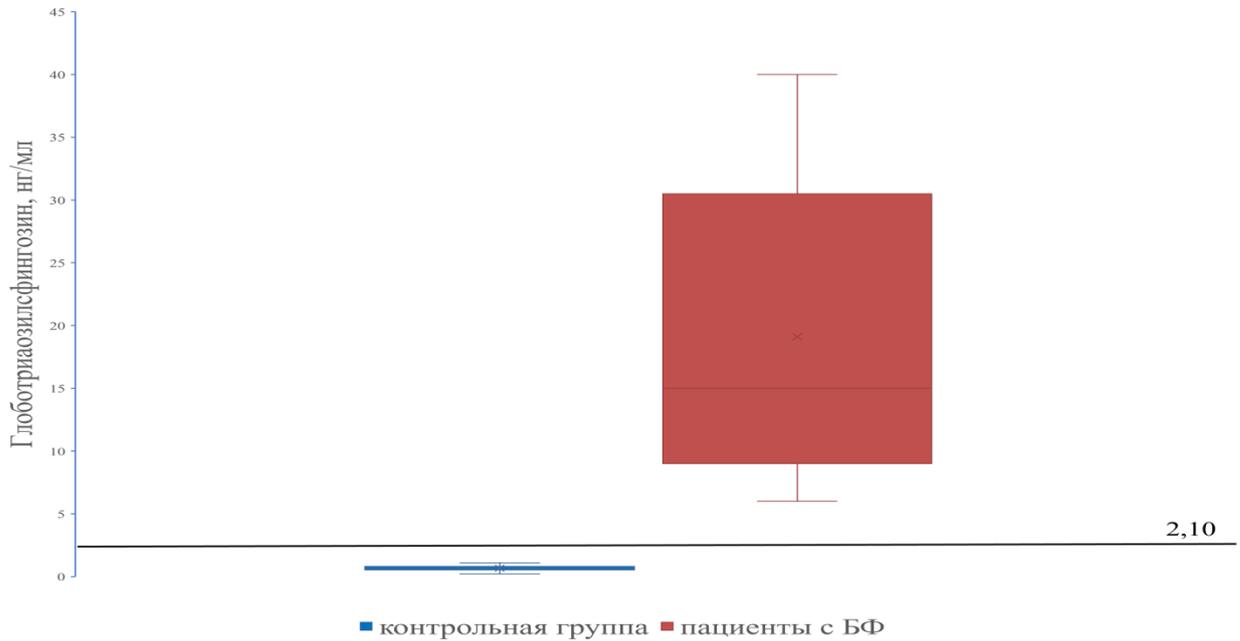


Рисунок 5 – Показатели концентрации биомаркера глоботриаозилсфингозина в пятнах крови, высушенной на фильтровальной бумаге в контрольной группе и в группе пациентов с БФ.

#### 2.4. Лабораторные методы исследования

В работе были применены биохимические и молекулярно-генетические методы исследования. Диагноз БФ устанавливался на основании показателей активности фермента  $\alpha$ -гал А, концентрации биомаркера лизо-ГбЗ и данных молекулярно-генетического исследования гена *GLA* в соответствии с Российскими и Европейскими клиническими рекомендациями.

## 2.4.1. Биохимические методы исследования

Для определения активности фермента  $\alpha$ -гал А и концентрации субстрата лизо-Гб3 применяли технологию тандемной масс-спектрометрии с высокоэффективной жидкостной хроматографией.

### 2.4.1.1. Определение активности фермента $\alpha$ -галактозидазы

#### А

Определение ферментативной активности  $\alpha$ -гал А проводилось в соответствии с протоколом компании производителя (PerkinElmer, Inc., США). Для пробоподготовки использовали набор NeoLSD™ MSMS kit предназначенный для мультиплексного количественного измерения активности шести ферментов:  $\alpha$ -галактозидаза А,  $\beta$ -глюкоцеребронидаза,  $\alpha$ -сфингомиелиназа,  $\alpha$ -глюкозидаза,  $\beta$ -галактоцеребронидаза,  $\alpha$ -L-идуронидаза в сухих пятнах крови (DBS) для скрининга. Анализ ферментативной активности предназначен для определения ЛБН: болезнь Фабри, болезнь Гоше, болезнь Ниманн-Пика, болезнь Помпе, болезнь Краббе, болезнь МПС1 (мукополисахаридоз, тип1). Пробоподготовка осуществлялась в несколько этапов.

1. Прокол пятна крови, высушенного на фильтре диаметром 3,1 мм с использованием автоматизированного прибора DBS Puncher (PerkinElmer, США) и помещение этого диска в лунку 96-луночного планшета (плашки).

2. Добавление буфера 30 мкл для экстракции в каждую лунку плашки (NeoLSD Assay Buffer, pH  $4,7 \pm 0,05$ ).

3. Центрифугирование плашки при скорости 1500 оборотов в минуту в течение 1 минуты.

4. Ферментация. Помещение плашки в термошейкер PST-60HL-4 (Biosan, Латвия) на  $20 \pm 2$  часов (температура  $+37^\circ\text{C}$ , скорость 400 оборотов в минуту), снятие плашки с термошейкера по истечении заданного времени.

5. Остановка ферментативной реакции, путем добавления 200 мкл воды и 400 мкл этилацетата в каждую лунку и дальнейшее перемешивание на Вортексе (Biosan, Латвия, Multi-Spin, MSC-600) при скорости 2000 оборотов в минуту в течение 10 секунд.

6. Процесс жидкофазной экстракции с использованием центрифугирования и дальнейший перенос верхней фазы.

7. Упаривание до сухого остатка в концентраторе (Labconco, Германия) при 40 °С в течение 35 минут и растворение в подвижной фазе для дальнейшего масс-спектрометрического анализа.

Далее осуществлялся анализ методом ВЭЖХ–МС/МС на тандемном масс-спектрометре (AB SCIEX 3200MD QTRAP ®, США) с жидкостным хроматографом Nexera XR LC-20AD (Shimadzu, Япония). Хроматографическое разделение проводилось с использованием колонки для жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) Acclaim™ 3 мкм, 120Å 2.1 x 100 мм C8 HPLC Columns (Thermo Fisher, США). В качестве подвижной фазы использовали водный раствор ацетонитрила с добавлением муравьиной кислоты для лучшей ионизации при скорости 200 мкл/минуту. Объем инъекции составлял 10 мкл.

Масс-спектрометрическое детектирование проводилось в режиме регистрации положительных ионов с использованием электрораспылительной ионизации. Масс-анализатор работал в режиме сканирования ионов в соотношении массы к заряду в диапазоне от 5 до 1800 m/z. Время, затрачиваемое на анализ одной пробы, составляло 450 секунд. Расчет активности целевого анализа производился с помощью программного обеспечения для масс-спектрометрии (Analyst® MD 1.6.2 software, включая программное обеспечение Reporter), путем автоматического соотношения полученных в ходе проведенного анализа показателей с концентрациями соответствующего рабочего стандарта (рисунок 6). Программное обеспечение Analyst® MD 1.6.2 отвечает за получение и обработку данных и не выдает никаких клинических заключений.

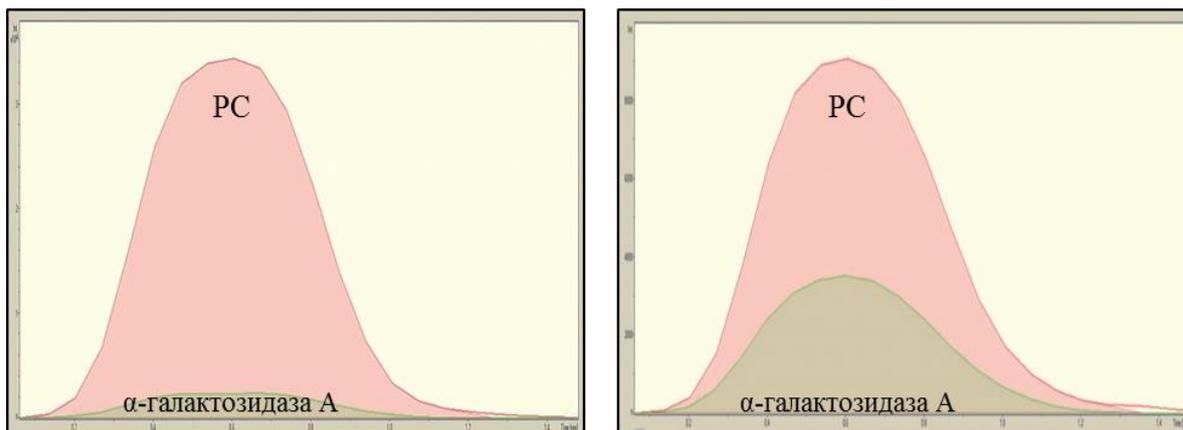


Рисунок 6 – Хроматограммы рабочего стандарта (РС) активности фермента  $\alpha$ -гал А ( $\alpha$ -галактозидаза А) и анализа у пациента с БФ (слева) и здорового человека (справа) в мкмоль/литр/час (по оси ординат – интенсивность, по оси абсцисс – время в минутах)

Для образцов со сниженной активностью фермента  $\alpha$ -гал А в качестве внутреннего контроля учитывался любой другой фермент из 6 ферментов в наборе. Образцы, в которых было зафиксировано снижение активности двух и более ферментов, считались непригодными для проведения исследования.

### 2.3.1.2. Определение концентрации глоботриаозилсфингозина

Для определения концентрации биомаркера лизо-Гб3 использовали систему тандемной масс-спектрометрии ВЭЖХ–МС/МС состоящую из хроматографа высокого давления Agilent infinity 1260 (Agilent, США) с двумя бинарными насосами и квадруполь-времяпролетного масс-спектрометра Maxis Impact (Bruker, Германия). Получение дисков, диаметром 3,1 мм из сухих пятен крови осуществляли с помощью автоматического прибора для подготовки дисков (панчера) DBS Puncher (PerkinElmer, США)

Хроматографическое разделение проводилось на колонке YMC-Triart C18/S (YMC, Япония) с размером частиц 3 мкм и размером пор 12 нм с геометрическими размерами 50 × 2 мм. Объемная скорость элюента

составляла 200 мкл/мин, объем инъекции 20 мкл. Масс-анализатор работал в режиме преобразования ионов в диапазоне 100–800  $m/z$  с точностью определения масс не ниже 5 ppm и разрешением не менее 40 000–60 000 FWHM (полная ширины на уровне половины высоты пика (от англ. full width at half maximum)). Время анализа одного образца составляло 14 минут.

Перед проведением исследования проводилась калибровка аналитической системы в диапазоне концентраций лизо-Гб3 1,0–50,0 нг/мл. Калибровочная характеристика нормировалась в соответствии с квадратом коэффициента корреляции  $R$ , составившим не менее 0,9950. Концентрация нижнего предела количественного определения лизо-Гб3 составила 1,0 нг/мл, концентрация среднего предела детектирования лизо-Гб3 – 5,0 нг/мл, концентрация высокого предела детектирования лизо-Гб3 – 50,0 нг/мл (рисунок 7).

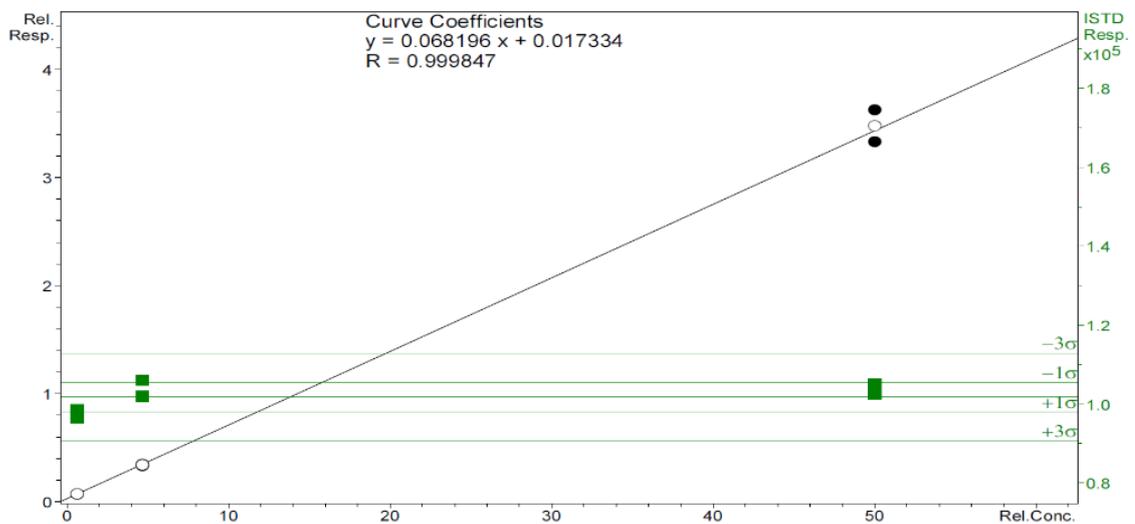


Рисунок 7 – Калибровочный график и значение коэффициента корреляции  $R$

Рассчитанные в ходе проведенного анализа соотношения показателей площади пика, времени выхода пика и интенсивности пика с концентрациями соответствующего стандартного раствора позволили

определить концентрацию лизо-Гб3 при помощи программного обеспечения Bruker Data Analysis 4.1 в автоматическом режиме (рисунок 8).

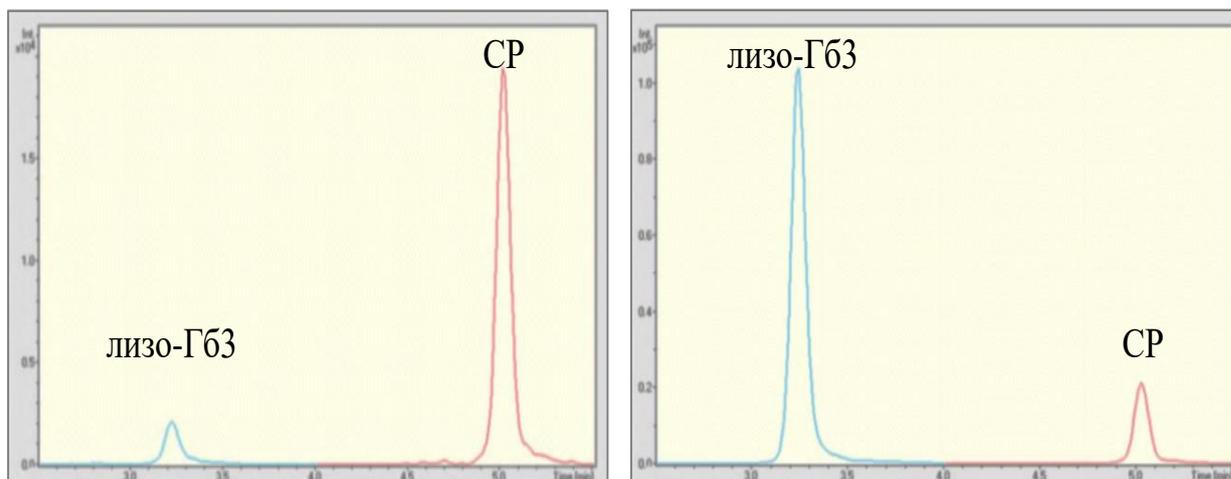


Рисунок 8 – Хроматограммы аналита лизо-Гб3 (глоботриаозилсфингозин) и стандартного раствора (СР). Диапазон концентраций лизо-Гб3 1,0–50,0 нг/мл (по оси ординат – интенсивность, по оси абсцисс – время в минутах)

В качестве внутреннего положительного контроля использовали образцы сухих пятен крови пациентов, с установленным диагнозом БФ биохимическими и молекулярно-генетическими методами, взятых до начала ферментозаместительной терапии.

#### **2.4.2. Молекулярно-генетические методы диагностики болезни Фабри**

В действующих российских клинических рекомендациях прописан следующий алгоритм лабораторной диагностики БФ [13].

1. Измерение ферментативной активности  $\alpha$ -гал А.
2. Выявление патогенных вариантов гена *GLA* методом секвенирования по Сэнгеру всех кодирующих и прилегающих интронных областей исследуемого гена.

Этот двухэтапный алгоритм в большинстве случаев позволяет подтвердить либо исключить диагноз.

### 2.4.2.1. Выделение ДНК

Выделение геномной ДНК из крови проводили на автоматической станции QIAcube (QIAGEN, Германия) с помощью наборов реактивов DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Германия), в качестве исходного материала использовали пятна крови, высушенные на фильтровальной бумаге, или цельную кровь. Все манипуляции выполнялись в строгом соответствии с протоколом компании производителя (QIAGEN, Германия). Элюция ДНК осуществлялась в объеме 30–100 мкл воды без ДНКаз. Качество и количество ДНК оценивали спектрофотометрически Nano Vue (GE Healthcare, Швеция), а также с использованием набора Qubit dsDNA HS Assay Kit для флуориметра Qubit 3.0 (Invitrogen, США).

### 2.4.2.2. Полимеразная цепная реакция

Для амплификации кодирующих и прилегающих интронных областей гена *GLA* использовали метод ПЦР. Реакция проводилась в объеме 10 мкл в следующего состава:

- 1) геномная ДНК – 2,0 мкл;
- 2) олигонуклеотиды (3 нМ) – 4 мкл;
- 3) вода деионизированная – 4 мкл;
- 4) буфер Amplitaq Gold 360 (Thermo Fisher, США) – 10 мкл.

Для проведения ПЦР олигонуклеотиды подбирались с помощью программного обеспечения Beacon Designer v 8.10 (Premier Biosoft International, США), для проверки специфичности праймеров использовался онлайн-ресурс Primer-BLAST (NCBI). Синтез олигонуклеотидов производился в ЗАО «Евроген» (Россия). Последовательности олигонуклеотидов приведены в таблице 4.

Амплификацию проводили на термоциклерах ProFlex (Thermo Fisher Scientific, США) и Bio-Rad T100 (Bio-Rad, США). Реакция ПЦР проводилась при следующих условиях: 95 °C – 10 мин (*1-й цикл*); 95 °C – 30 с, 60 °C – 30

с, 72 °С – 1 мин (35 циклов); 72 °С – 5 с (последний цикл). Анализ продуктов амплификации проводили в 1-2%-ном агарозном геле, который был приготовлен на основе агарозы Biotechnology Grade (Amresco, США). Визуализацию осуществляли в ультрафиолетовом свете после окрашивания агарозного геля бромистым этидием на приборе Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ Imaging System (Bio-Rad, США).

Таблица 4 – Последовательности олигонуклеотидов для 7 экзонов гена *GLA*

Экзон	Название праймера	Последовательность праймера	Длина продукта, п.н.
1	GLA-ex1-FM13-f GLA-ex1-RM13-r	5'-GTAAAACGACGGCCAGTCGCA CTTCCTTCTGGTAT-3' 5'-CAGGAAACAGCTATGACGGTC ACACAGAGAAAGTTTAG-3'	621
2	GLA-ex2-FM13-f GLA-ex2-RM13-r	5'-GTAAAACGACGGCCAGTTTT CTCATTCCTATTTTGTTTG-3 5'-CAGGAAACAGCTATGACGAAG TGCTTACAGTCCTCT-3	453
3	GLA-ex3-FM13-f GLA-ex3-RM13-r	5'-GTAAAACGACGGCCAGTCCAA TACCTGGTGAAGTAAC-3' 5'-CAGGAAACAGCTATGACATGA ACTGAAAGAGAAGAGATG-3'	454
4	GLA-ex4-FM13-f GLA-ex4-RM13-r	5'-GTAAAACGACGGCCAGTTGGA TGACAGACTGAACC-3' 5'-CAGGAAACAGCTATGACAGAG ATGGTAGGATGATAGTAAG-3'	330
5–6	GLA-ex5-6-FM13-f GLA-ex5-6-M13-r	5'-GTAAAACGACGGCCAGTTCAA GAGAAGGCTACAAGT-3' 5'-CAGGAAACAGCTATGACATAG TAACATCAAGAGCAAGG-3'	770
7	GLA-ex7-FM13-f GLA-ex7-RM13-r	5'-GTAAAACGACGGCCAGTTGGC TTTATATACCCAATACCAACT-3' 5'-CAGGAAACAGCTATGACTGAG CTTTTAAAGTGAATGGAGAAA-3'	602

### 2.4.2.3. Секвенирование методом Сэнгера

При проведении секвенирования методом Сэнгера был использован набор реактивов BigDye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Все манипуляции выполнялись в строгом соответствии с протоколами и рекомендациями производителя. Амплификацию проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 300 нмоль смеси M13 (M13-forward, GTAAAACGACGGCCAGT или M13-revers CAGGAAACAGCTATGAC), на термоциклерах ProFlex. Условия реакции: 98 °C – 3 мин (*1-й цикл*); 98 °C – 10 с, 50 °C – 10 с; 60 °C – 4 мин (*27 циклов*). Разделение фрагментов ДНК путем капиллярного электрофореза было выполнено на автоматических секвенаторах ДНК ABI 3500 и ABI 3500XL (Thermo Fisher Scientific, США). По результатам анализа проводилось сопоставление полученных последовательностей с рефересными последовательностями RefseqGene из базы данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI) [14].

### 2.4.2.4. Высокопроизводительное секвенирование

Таргетные области генов *ACTC1*, *DES*, *FLNC*, *TPM1*, *TTR*, *TNNI3*, *GLA*, *LAMP2*, *MYH7*, *TNNC1*, *TNNT2*, *MYBPC3*, *MYL2*, *MYL3*, *PTPN11*, *PLN* и *PRKAG2* были проанализированы при помощи метода высокопроизводительного секвенирования. Обогащение целевыми фрагментами проводилось с использованием кастомной панели зондов SeqCapEZ (Roche, USA, Santa Clara). Суммарный размер панели составлял 104950 нуклеотидов, средняя глубина чтения была 240x доля нуклеотидов с покрытием более 50x более 99%. Секвенирование проводилось на платформах MiSeq (Illumina, USA, San Diego) и NextSeq550DX (Illumina, USA, San Diego).

#### 2.4.2.5. Биоинформатический анализ

Анализ патогенности проводился для всех выявленных вариантов с частотой менее 1% по базе данных gnomAD v.4.1.0 (<http://gnomad.broadinstitute.org>) 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) [Genome Aggregation Database (gnomAD). URL: <https://gnomad.broadinstitute.org>], а также с помощью руководства по интерпретации данных последовательности нуклеотидов ДНК человека [10]. Сравнение последовательностей нуклеотидов с базой данных GenBank Accession проводили при помощи программного обеспечения Geneious R10 (Biomatters, Новая Зеландия) [GenBank Accession URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>].

#### 2.5. Метод статистического анализа

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с использованием программ IBM SPSS Statistica v 26 (IBM StatSoft, США) и Microsoft Excel (Microsoft, США). Сравнение данных проводили с применением *p*-критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони, а также критериев Уилкоксона, Краскела-Уоллиса. Для бинарных показателей использовали критерий  $\chi^2$  Пирсона. Для оценки статистической значимости между генотипом и клиническими проявлениями у пациентов БФ использовали критерии Фишера с поправкой Бонферрони и коэффициент корреляции Спирмена [56]. Пакет программы Bruker Data Analysis 4.1(США) использовался для обсчета данных значений активности фермента  $\alpha$ -гал А и концентрации субстрата лизо-ГбЗ. Для определения отрезных точек измерения активности  $\alpha$ -гал А и концентрации лизо-ГбЗ применяли метод

ROC–анализа на основе предложенного Griner с соавторами в 1981 году [49]. Реализованного в нашем исследовании с помощью программы IBM SPSS Statistica v 26 (IBM StatSoft, США). Различия считались статистически значимыми при уровне достоверности  $p < 0,05$  [2].

Интерпретация данных осуществлялась в соответствии значений коэффициента корреляции  $r_{xy}$  и силе взаимосвязи согласно по шкале Чеддока (таблица 5).

Таблица 5 – Соответствие значения коэффициента корреляции силы взаимосвязи по шкале Чеддока

Значение коэффициента	Характеристика тесноты корреляционной связи
0–0,1	Практически отсутствует
0,1–0,3	Слабая
0,3–0,5	Умеренная
0,5–0,7	Заметная
0,7–0,9	Сильная
0,9–0,99	Очень сильная
0,99–1,0	Практически функциональная

## 2.6. Перечень требований к биоматериалу

Объективные оценочные требования к пятнам крови:

1. Образцы сухих пятен крови пациентов возрастной категории от 0 до 75 лет.
2. Образцы сухих пятен крови пациентов мужского и женского пола.
3. Образцы сухих пятен крови пациентов с подозрением на БФ, или наличие данного диагноза у родственника первой степени родства.
4. Образцы сухих пятен крови пациентов, имеющие заполненное направление с указанием: ФИО пациента, даты рождения, пола пациента, контактных данных врача, населенного пункта, вида назначаемого исследования.

5. Высушенные образцы пятен крови должны быть нанесены на стандартную фильтровальную бумагу стандартного типа Whatman 903 (Whatman, США).

Критерии исключения сухих пятен крови из лабораторной диагностики

1. Образцы сухих пятен крови пациентов, не имеющие заполненного направления с указанием: ФИО пациента, даты рождения, пола пациента, контактных данных врача, населенного пункта, вида исследования.

2. Образцы сухих пятен крови, нанесенные на другой вид фильтровальной бумаги, отличный от стандарта Whatman 903.

3. Доставленные образцы сухих пятен крови неправильно хранили/транспортировали в условиях повышенной влажности и конденсата, также загрязненные, мятые и порванные.

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И 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.

#### 3.1. Селективный скрининг болезни Фабри

Для проведения селективного скрининга было отобрано 10300 пациентов из групп высокого риска с подозрением на классическую форму и 1956 пациентов с подозрением на атипичную форму БФ. Возраст пациентов составил от 7 до 71 года, с подозрением на классическую форму (9167 мужского пола и 1133 женского пола, 8:1 соответственно), а с подозрением на атипичную форму БФ соотношение полов составило 2:1 (1369 мужского пола и 587 женского пола). Проведенный скрининг позволил выявить 36 (0,29%) пациентов: с классической формой БФ 28 (0,27%) неродственных случаев, и с атипичной формой БФ 8 (0,41%) неродственных случаев. Вычисленная частота случаев БФ, равная 0,29% соответствует исследованиям иностранных коллег, проведенным ранее [136].

При проведении селективного скрининга на классическую форму у (21/0,20%) пациента мужского пола было выявлено снижение активности фермента  $\alpha$ -гал А и у (22/0,21%) повышение концентрации биомаркера лизо-Гб3. Подтверждение поставленного диагноза БФ на основании клинических проявлений и биохимического анализа активности фермента  $\alpha$ -гал А, осуществляли с помощью молекулярно-генетической диагностики, осуществляя секвенирование методом Сэнгера семи кодирующих экзонов гена *GLA* с прилегающими интронными областями. В результате у 22

пациентов мужского пола были обнаружены гемизиготные каузальные варианты гена *GLA*. Один мужчина имел ложноотрицательный результат активности фермента  $\alpha$ -гал А с концентрацией лизо-Гб3, равной 8,58 нг/мл (норма <2,10 нг/мл). При молекулярно-генетическом анализе был выявлен патогенный вариант *c.758T>C* гена *GLA*. Этот вариант был описан ранее у пациентов с атипичным течением БФ [79].

Всем женщинам измеряли ферментативную активность  $\alpha$ -гал А, а также концентрацию лизо-Гб3 в сухих пятнах крови, методом ТМС. В рамках осуществления селективного скрининга ферментативная активность была снижена у 4 (0,35%) женщин, тогда как концентрация субстрата лизо-Гб3 была повышена у 6 (0,53%) женщин. Вследствие высокого числа ложноотрицательных случаев измерения активности фермента  $\alpha$ -гал А у женщин с БФ существует высокая вероятность пропуска пациента с БФ, используя только измерение активности фермента  $\alpha$ -гал А. Всем 1133 женщинам проводилось двунаправленное секвенирование экзонов 1–7 гена *GLA*, включая прилегающие интронные области. Дополнительный анализ концентрации субстрата лизо-Гб3 и ферментативной активности  $\alpha$ -гал А у пациентов женского пола с нуклеотидными вариантами гена *GLA* сводит к нулю вероятность пропуска женщин с БФ, значительно повышая диагностическую эффективность исследования [5]. 10 пациентов с БФ, выявленные нами при помощи секвенирования по Сэнгеру гена *GLA* до проведения описываемого селективного скрининга, имели низкую ферментативную активность и завышенную концентрацию биомаркера, использовались в исследовании в качестве дополнительного внутреннего положительного контроля.

### **3.1.1. Определение активности фермента $\alpha$ -галактозидазы А в сухих пятнах крови пациентов с классической формой болезни Фабри**

Значения ферментативной активности  $\alpha$ -гал А в сухих пятнах крови с медианой, средним, интерквартильным размахом, максимальными и

минимальными значениями в группе пациентов с каузальными вариантами гена *GLA*, а также в контрольной группе представлены в табличном (таблица 6) и графическом (рисунок 9) виде. Оптимальная отрезная точка для определения ферментативной активности  $\alpha$ -гал А составила 1,89 мкмоль/л/ч, что соответствует зарубежным данным [128].

Таблица 6 – Показатели ферментативной активности  $\alpha$ -гал А 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
Активность фермента $\alpha$ -гал А, мкмоль/л/час	0,23–4,34	2,23–19,20
<i>медиана</i>	0,75	6,23
<i>среднее</i>	0,97±0,9	6,09±3,7

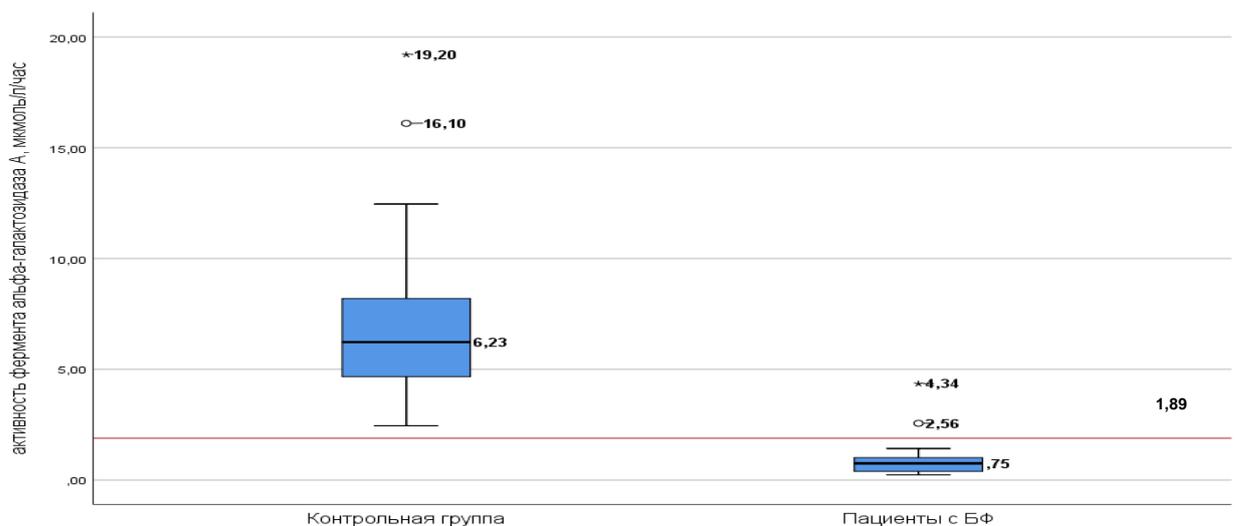


Рисунок 9 – Сравнение значений ферментативной активности  $\alpha$ -гал А в группе пациентов с классической формой БФ и контрольной группе

Значения ферментативной активности  $\alpha$ -гал А у пациентов мужского пола с классической формой БФ расположены ниже и не перекрываются значениями ферментативной активности  $\alpha$ -гал А у пациентов-мужчин из группы контроля. В то время как значения ферментативной активности  $\alpha$ -гал А у пациентов женского пола из основной группы (пациенты с классической формой БФ) частично перекрываются со значениями ферментативной активности  $\alpha$ -гал А у пациентов-женщин из группы контроля (рисунок 10), что указывает на невысокую диагностическую эффективность определения ферментативной активности  $\alpha$ -гал А для диагностики БФ у женщин и подтверждается зарубежными литературными данными [69].

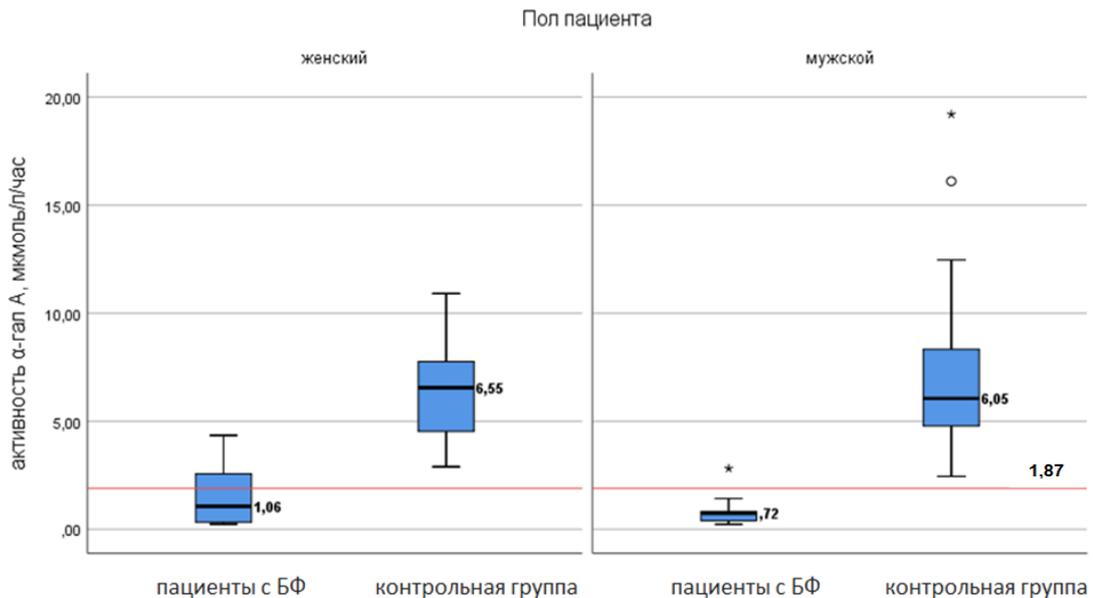


Рисунок 10 – Сравнение значений ферментативной активности  $\alpha$ -гал А у пациентов с классической формой БФ обоих полов в основной и контрольной группах

Для оценки диагностической значимости определения ферментативной активности  $\alpha$ -гал А при БФ была построена ROC-кривая для пересчета чувствительности и специфичности. Чувствительность метода составляла 95,5%, а специфичность 95,8% при отрезной точке 1,89  $\mu\text{моль/л/ч}$  активности фермента  $\alpha$ -гал А. При пересчете площадь под ROC-кривой,

соответствующей взаимосвязи пациентов мужского пола с БФ и активности фермента  $\alpha$ -гал А, составила  $AUC=0,968$ . Полученная модель была статистически значимой ( $p<0,001$ ). Значения чувствительности и специфичности определения активности фермента  $\alpha$ -гал А мкмоль/л/ч при оптимальной отрезной точке 1,87 мкмоль/л/час составили 95,5% и 98,1% соответственно, из-за переноса пациента имевшего ложноположительный результат в группу истинно отрицательных (рисунок 11).

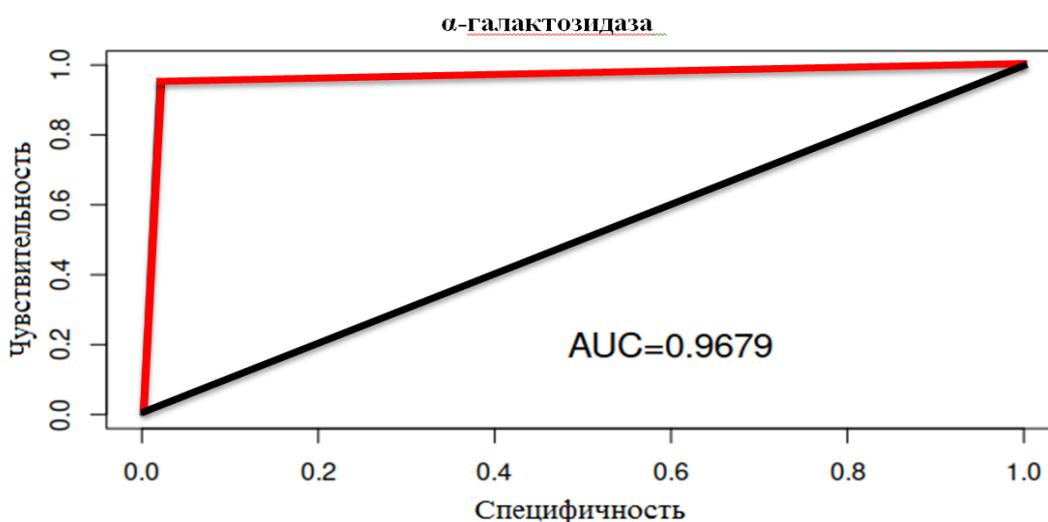


Рисунок 11 – ROC–кривая метода определения активности  $\alpha$ -гал А в группе пациентов с классической формой БФ и контрольной группе

### **3.1.2. Определение концентрации глоботриаозилсфингозина в сухих пятнах крови у 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 той же контрольной группе представлены в табличном (таблица 7) и графическом (рисунок 12) виде. В целях вычисления отрезной точки и интервала нормальных значений

концентрация субстрата лизо-Гб3 измерялась в группе контроля из 100 здоровых доноров, которая использовалась для определения интервала нормальных значений ферментативной активности  $\alpha$ -гал А. У 10 (8 мужчин и 2 женщины) пациентов с диагнозом БФ, установленным до проведения описываемого селективного скрининга, была определена высокая концентрация лизо-Гб3, что использовалось в качестве внутреннего положительного контроля при измерении концентрации субстрата. Эти данные позволили вычислить оптимальную отрезную точку концентрации субстрата лизо-Гб3, равную 2,10 нг/мл для дальнейшего исследования.

Таблица 7 – Показатели концентрации биомаркера лизо-Гб3 в группе пациентов с классической формой 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

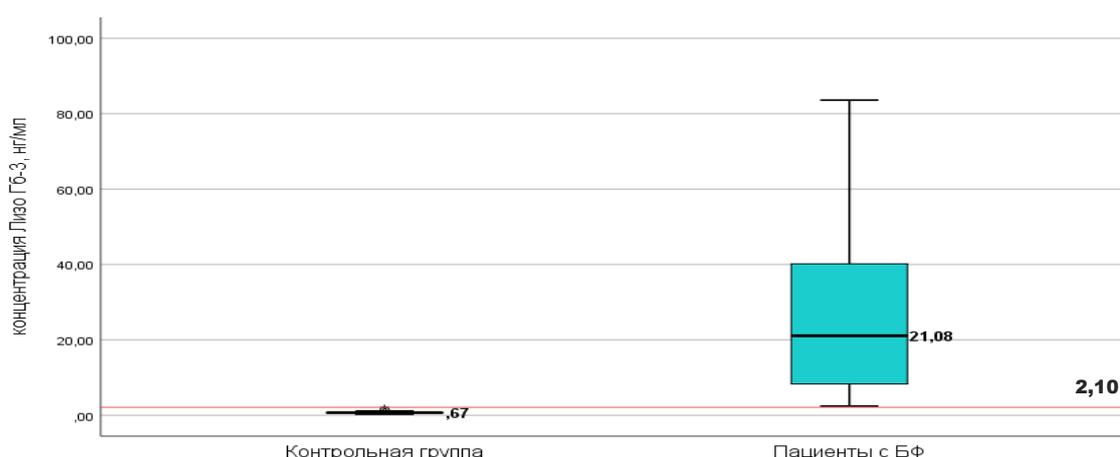


Рисунок 12 – Сравнение значений концентрации субстрата лизо-Гб3 в группе пациентов с классической формой БФ и контрольной группе.

Диапазоны значений концентрации субстрата лизо-Гб3 в сухих пятнах крови у мужского и женского пола пациентов с классической формой БФ, а также в контрольной группе представлены в табличном (таблица 8) и графическом (рисунок 13) виде. Очевидно, что интервал значений концентраций субстрата лизо-Гб3 здоровых доноров из группы контроля лежит ниже и не перекрывается со значениями концентраций субстрата лизо-Гб3 у пациентов с БФ обоих полов.

Таблица 8 – Показатели концентрации биомаркера лизо-Гб3 у пациентов обоих полов с классической формой БФ в группах случая и контроля

Параметр сравнения	Группа пациентов с БФ		Контрольная группа	
	Мужчины	Женщины	Мужчины	Женщины
Число пациентов	22	6	76	24
Концентрация лизо-Гб3, нг/мл	6,91–83,0	2,45–47,99	0,10–1,94	0,05–1,90
<i>медиана</i>	26,30	4,72	0,68	0,63

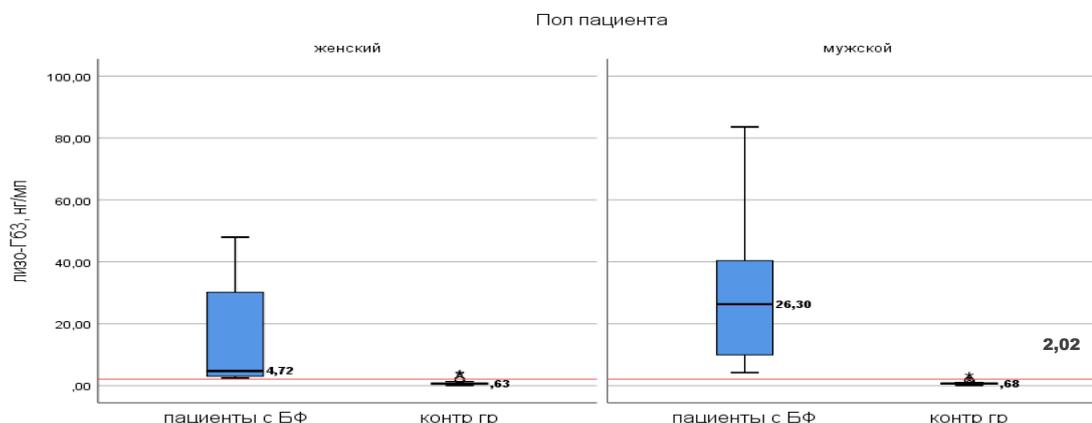


Рисунок 13 – Сравнение значений концентраций субстрата лизо-Гб3 у пациентов с классической формой БФ обоих полов и в группе контроля

При оценке диагностической значимости концентрации биомаркера лизо-Гб3 при БФ определяли с помощью построения ROC-кривой для оптимальной чувствительности и специфичности. Площадь под ROC-кривой, соответствующей взаимосвязи БФ и концентрации биомаркера лизо-

Гб3 нг/мл, составила AUC=1,0. Полученная модель была статистически значимой ( $p<0,001$ ). Наилучшее сочетание чувствительности и специфичности метода составило соответственно 100% и 100% лизо-Гб3 при отрезной точке равно 2,02 нг/мл (рисунок 14). Эти данные позволили вычислить оптимальную отрезную точку концентрации субстрата лизо-Гб3, равную 2,02 нг/мл, что не противоречит данным, полученным другими учеными [85].

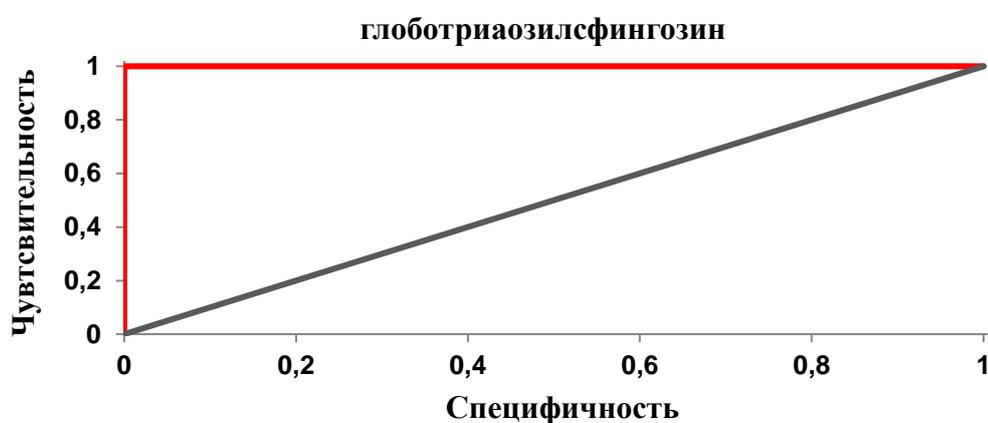


Рисунок 14 – ROC–кривая метода определения концентрации лизо-Гб3 в группе пациентов с классической формой БФ и контрольной группе

### 3.1.3. Выявление патогенных вариантов гена *GLA* методом секвенирования по Сэнгеру

Молекулярно-генетическое исследование проведено у 28 пробандов с диагнозом БФ, подтвержденных на основании результатов биохимического исследования и клинической картины. В результате исследования обнаружено 28 патогенных вариантов в гене *GLA*, 17 вариантов, которые были описаны ранее в базе данных HGMD как причины БФ, и 11 ранее не описанных вариантов, патогенность которых была оценена на основе биоинформатических модулей, 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 человека.

Результаты проведенного селективного скрининга на БФ и описание нуклеотидных вариантов приведены в таблице 9.

Таблица 9 – Нуклеотидные варианты гена *GLA*, выявленные у пробандов в результате проведенного селективного скрининга на классическую форму болезни Фабри

№ п/п	Пол	Возраст	Нуклеотидный вариант, аминокислотный вариант	Тип мутации	Описание в базе HGMD	Анализ патогенности
1	ж	67	<i>c.19G&gt;T, p.(Glu7*)</i>	нонсенс	да	патогенный
2	м	10	<i>c.161T&gt;C, p.(Leu54Pro)</i>	миссенс	да	патогенный
3	м	41	<i>c.101A&gt;G, p.(Asn34Ser)</i>	миссенс	да	патогенный
4	м	7	<i>c.269G&gt;A, p.(Cys90Tyr)</i>	миссенс	не описана	патогенный
5	м	16	<i>c.334C&gt;T, p.(Arg112Cys)</i>	миссенс	да	патогенный
6	ж	64	<i>c. 375 del, p.(His125Glnfs*5)</i>	делеция	не описана	патогенный
7	м	31	<i>c.442_450del, p.(Ser148_Gly150del)</i>	делеция	не описана	патогенный
8	м	27	<i>c.539_547+9del, p.(Leu180_Gly183deletion)</i>	делеция	не описана	патогенный
9	м	30	<i>c.551A&gt;G, p.(Tyr184Cys)</i>	миссенс	не описана	вероятно патогенный
10	м	40	<i>c.560T&gt;A, p.(Met187Lys)</i>	миссенс	не описана	вероятно патогенный
11	ж	42	<i>c.613C&gt;A,</i>	миссенс	да	патогенный

№ п/п	Пол	Возраст	Нуклеотидный вариант, аминокислотный вариант	Тип мутации	Описание в базе HGMD	Анализ патогенности
			<i>p.(Pro205Thr)</i>			
12	м	25	<i>c.658C&gt;T, p.(Arg220*)</i>	нонсенс	да	патогенный
13	м	33	<i>c.671A&gt;C, p.(Asn224Ser)</i>	миссенс	да	патогенный
14	ж	57	<i>c.679C&gt;T, p.(Arg227*)</i>	нонсенс	да	патогенный
15	ж	25	<i>c.680G&gt;A, p.(Arg227Gln)</i>	миссенс	да	патогенный
16	м	51	<i>c.758T&gt;C, p.(Ile253Thr)</i>	миссенс	да	патогенный
17	м	48	<i>c.782G&gt;T, p.(Gly261Val)</i>	миссенс	да	патогенный
18	м	45	<i>c.859T&gt;C, p.(Trp287Arg)</i>	миссенс	да	патогенный
19	м	68	<i>c.895G&gt;C, p.(Asp299His)</i>	миссенс	не описана	вероятно патогенный
20	м	26	<i>c.901C&gt;T, p.(Arg301*)</i>	нонсенс	да	патогенный
21	м	51	<i>c.1021G&gt;A, p.(Glu341Lys)</i>	миссенс	да	патогенный
22	м	24	<i>c.1033_1034 del, p.(Ser345Argfs*29)</i>	делеция	да	патогенный
23	м	55	<i>c.1072_1074del, p.(Glu358del)</i>	делеция	да	патогенный
24	м	28	<i>c.1134T&gt;A, p.(Cys378*)</i>	нонсенс	не описана	патогенный
25	м	30	<i>c.1134T&gt;A, p.(Cys378*)</i>	нонсенс	не описана	патогенный
26	м	30	<i>c.1228A&gt;G, p.(Thr410Ala)</i>	миссенс	да	патогенный
27	ж	10	<i>c.1231G&gt;C, p.(Gly411Arg)</i>	миссенс	не описана	вероятно патогенный
28	м	40	<i>c.1231G&gt;C, p.(Gly411Arg)</i>	миссенс	не описана	вероятно патогенный

Как видно из представленных данных таблицы 9 в гене *GLA* идентифицировано 26 различных нуклеотидных вариантов. Нонсенс-вариант *c.1134T>A, p.(Cys378\*)* и миссенс-вариант *c.1231G>C, p.(Gly411Arg)*, были обнаружены дважды у неродственных пробандов.

Патогенные варианты были выявлены во всех 7 экзонах гена *GLA*. Относительные частоты мутации в экзонах гена *GLA* при классической формы БФ, представленные на рисунке 15. Показывают, что более половины всех идентифицированных вариантов приходится на экзоны 5 (21%) и 7 (29%), а меньше всего во 2 экзоне (7%), в оставшихся экзонах варианты были распределены поровну в 1, 3, 4 и 6 экзонах по (11%).

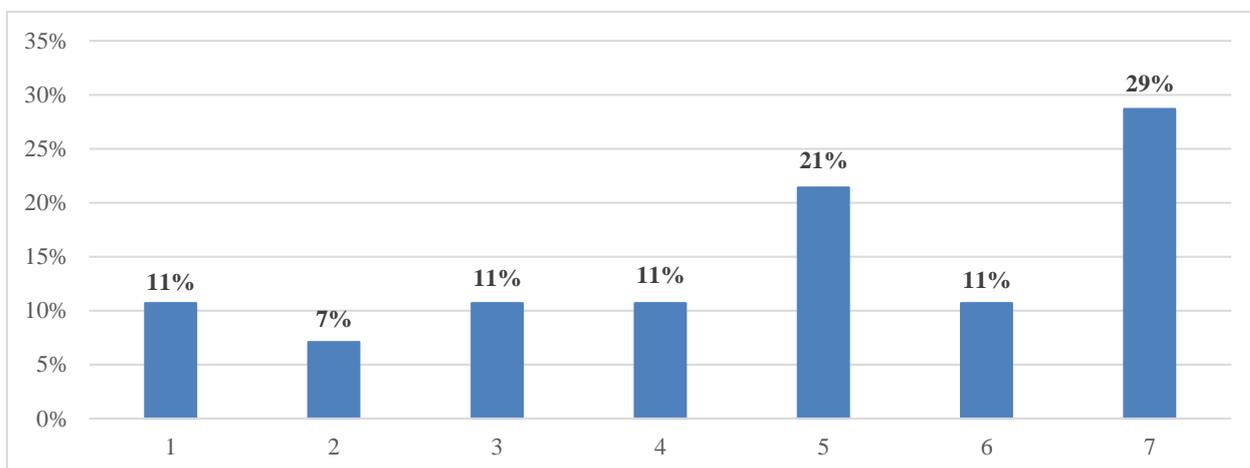


Рисунок 15 – Относительные частоты мутаций гена *GLA* в различных экзонах (1–7 – номера экзонов гена *GLA*), приводящих к развитию классической формы БФ в РФ.

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 16).

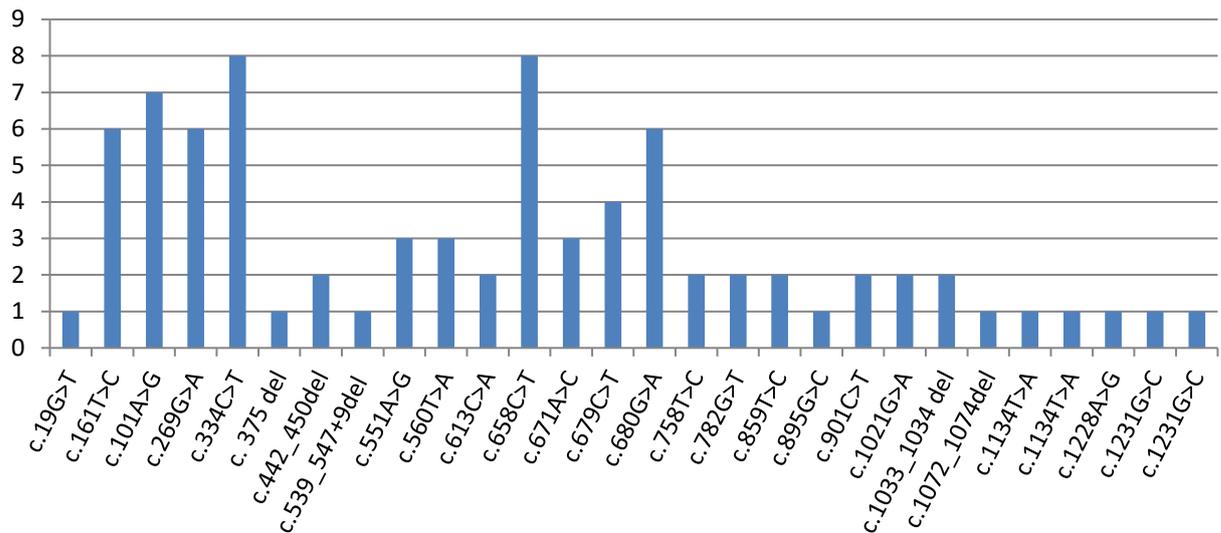


Рисунок 16 – Структура семейных случаев с классической формой БФ в РФ.

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.

В проводимых ранее научных исследованиях Л.Т. Голивец в 2015 году и К.В. Савостьяновым в 2019 году по изучению классической формы болезни Фабри в Российской Федерации, были изучены клинико-генеалогические и молекулярно-генетические особенности БФ у российских пациентов [3, 11]. В нашей работе по изучению классической формы БФ спектр каузальных вариантов гена *GLA* отличается от описанного спектра вариантов в работах вышеуказанных авторов, а также выявлены новые каузальные варианты гена *GLA*, не описанные ранее в базе HGMD.

#### **3.1.4. Селективный скрининг российских пациентов с подозрением на атипичную форму БФ методом высокопроизводительного секвенирования**

Для выявления заболеваемости БФ среди российских больных с ГКМП было проведено секвенирование образцов крови, полученных от 1956 российских пациентов. Методом высокопроизводительного секвенирования

были исследованы таргетные области генов *ACTC1*, *DES*, *FLNC*, *TPM1*, *TTR*, *TNNI3*, *GLA*, *LAMP2*, *MYH7*, *TNNC1*, *TNNT2*, *MYBPC3*, *MYL2*, *MYL3*, *PTPN11*, *PLN* и *PRKAG2*. Эта панель была разработана нами для диагностики ГКМП, включая атипичную форму БФ, обусловленную мутациями в гене *GLA*. На основе полученных экспериментальных данных, было показано, что у пациентов с ГКМП патогенные варианты выявляются преимущественно в перечисленных генах [123]. Диагностика БФ с использованием предложенной и апробированной панели позволяет выявить причину ГКМП связанную с патогенными вариантами в других генах. По данным биоинформатического анализа были выявлены 12 (0,6%) пациентов (5 (41,7%) мужчины и 7 (58,3%) женщин) в возрасте  $60,4 \pm 9,2$  лет с каузальными генетическими вариантами в гене *GLA*, что согласуется с данными скрининговых программ на БФ, проводившихся в когортах больных с кардиологическими заболеваниями, включающими ГКМП [36]. Из этих двенадцати пациентов у восьмерых были выявлены миссенс варианты, у девятого – делеция в branch point site, у десятого – делеция фреймшифт, у одиннадцатого – дупликация двух нуклеотидов, у двенадцатого – синонимичный вариант в каноническом сайте сплайсинга.

У 64-летней женщины с нормальной ферментативной активностью и нормальной концентрацией субстрата был выявлен патогенный вариант *c.967C>A*, *p.(Pro323Thr)* (rs147737890), описанный в международной базе HGMD у пациентов с БФ [139]. У 49-летней женщины со сниженной активностью  $\alpha$ -гал А и повышенной концентрацией лизо-Гб3 был выявлен вероятно патогенный вариант *c.897C>A*, *p.(Asp299Gln)*, не описанный ранее, однако в базе данных HGMD описан вариант *c.897C>G*, приводящий к той же замене аминокислотных остатков *p.(Asp299Glu)*, у пациентов с БФ [76]. У двух мужчин, не являющимися родственниками 53-летнего и 42-летнего мужчины со сниженной активностью фермента и повышенной концентрацией субстрата был обнаружен патогенный вариант *c.902G>A*, *p.(Arg301Gln)* (rs104894828), описанный ранее в международной базе HGMD

у пациентов с БФ, в том числе, с атипичной формой [66]. У 69-летней женщины с нормальной активностью  $\alpha$ -гал А и нормальной концентрацией лизо-Гб3 был обнаружен вариант с неизвестной патогенностью *c.971T>G, p.(Leu324Trp)*, не описанный ранее. У 57-летней женщины с нормальной активностью  $\alpha$ -гал А и повышенной концентрацией субстрата был обнаружен патогенный вариант *c.899T>C, p.(Leu300Cys)*, описанный ранее в международной базе данных HGMD у пациентов с болезнью Фабри [129, 145]. У 66-летней женщины с нормальной активностью  $\alpha$ -гал А и повышенной концентрацией лизо-Гб3 был обнаружен патогенный вариант *c.782del, p.(Gly261Valfs\*8)*, приводящий к сдвигу рамки считывания, не описанный ранее. У 67-летнего мужчины со сниженной активностью фермента и повышенной концентрацией субстрата был обнаружен патогенный вариант *c.644A>G, p.(Asn215Ser)*, описанный ранее в международной базе данных HGMD у пациентов с БФ [80].

Биоинформатический анализ предсказал патогенность этого варианта по восьми информационным программным модулям из девяти использованных. Вероятно анализ сегрегации варианта *c.971T>G, p.(Leu324Trp)* у биологических родственников скринингового пациента наряду с измерениями биохимических показателей помог бы поставить точку в определении его патогенности, однако биоматериал от родственников оказался недоступен. Вариант *c.427G>A, p.(Ala143TThr)* (rs104894845), обнаруженный у 69-летней женщины с ГКМП и описанный неоднократно как патогенный [51], как вариант с неопределенной клинической значимостью (VUS) [38, 80], а также как вероятно доброкачественный и доброкачественный вариант [19]. Этот же вариант описывается в литературе как вариант с неполной пенетрантностью, вызывающий развитие поздней формы БФ у пациентов с ГКМП [137] и как вариант, вызывающий изолированную ГКМП [15].

Наше исследование может подтвердить лишь последнее описание, поскольку ни скрининговый пациент, ни один из его биологических

родственников, обладающих этой мутацией, не имеет экстракардиальных проявлений БФ при нормальных значениях измеренных нами биохимических показателей.

Дупликация *c.1288\_1289dup*, приводящая к исчезновению стоп кодона *p.(Ter430TyrextTer?)*, выявлена у 68-летней женщины со сниженной ферментативной активностью и повышенной концентрацией субстрата также не была описана ранее в базе данных HGMD (см. таблицу 10).

Кроме того, был обнаружен синонимичный вариант *c.546T>C*, *p.(Asp182=)*, расположенный в каноническом сайте сплайсинга в конце третьего экзона у 45-летнего мужчины с нормальными значениями  $\alpha$ -гал А и лизо-Гб3, не описанный ранее в базах данных HGMD и gnomAD (база данных с агрегированными сведениями о геномах), а также делеция *c.640-794\_640-791del*, расположенная глубоко в интроне в непосредственной близости от патогенного варианта *c.640-801G>A*, описанного у пациентов с поздней формой БФ с ГКМП [74], и выявленного нами у 51-летнего мужчины с нормальной активностью фермента  $\alpha$ -гал А и концентрацией субстрата лизо-Гб3 (см. таблицу 10).

Также в ходе скрининга у 11 пациентов был обнаружен вероятно доброкачественный вариант *c.937G>T*, *p.(Asp313Tyr)*, описанный в базе данных HGMD как вариант с противоречивой патогенностью [CM930335]. Двое мужчин и 9 женщин, обладающих этим вариантом, имели нормальные значения активности фермента  $\alpha$ -гал А и концентрации субстрата лизо-Гб3. Анализ данных российских пациентов с ГКМП, выявленных в ходе исследования, геном которых содержит патогенные, вероятно патогенные варианты, а также варианты с неизвестной клинической значимостью в гене *GLA*.

Среди всех найденных вариантов гена *GLA* в группе с атипичной формой БФ большую часть составляют патогенные миссенс варианты (9/75,0%). У (2/16,7%) пациентов выявлены различные делеции, которые расположены в 5 экзоне. У (1/8,3%) пациента обнаружена дупликация,

расположенная в 7 экзоне. Мутации обнаружены в 3, 5, 6 и 7 экзонах гена *GLA*. У пациентов с ГКМП больше всего обнаружено миссенс мутаций в 6 экзоне (5/41,6%) в таблице 10.

Таблица 10 – Выявленные нуклеотидные варианты в гене *GLA* у пробандов с ГКМП

№ п/п	Пол	Возраст, лет	Нуклеотидный вариант, аминокислотный вариант	$\alpha$ -гала, мкмоль/л/ч	Лизо-ГБЗ, (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.(Ter430TyrexTer?)</i>	0,88	4,60	дупликация	патогенный (PS3, PS2, PM2, PM4)	не описана
3	м	45	<i>c.546T&gt;C, p.(Asp182=)</i>	3,86	0,24	миссенс	вероятно доброкачественный (PM2, BS3, BP7)	не описана
4	ж	69	<i>c.427G&gt;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&gt;A, p.(Arg301Gln)</i>	0,22	7,40	миссенс	патогенный (PS3, PS4, PM1, PM2, PM5, PP1, PP2, PP3)	да
6	ж	64	<i>c.967C&gt;A, p.(Pro323Thr)</i>	2,36	2,05	миссенс	патогенный (PS3, PM1, PM2, PP2, PP3)	да
7	ж	69	<i>c.971T&gt;G, p.(Leu324Trp)</i>	4,25	0,79	миссенс	неизвестная клиническая значимость	да

							(PM2, PM5, PP2, PP3, BS3)	
8	ж	49	<i>c.897C&gt;A, p.(Asp299Gln)</i>	1,82	3,06	миссен с	патогенный (PS3, PM1, PM2, PM5, PP2, PP3, PP5)	не описана
9	ж	10	<i>c.899T&gt;C, p.(Leu300Cys)</i>	4,02	2,95	миссен с	патогенный (PS3, PS4, PM1, PM2, PM5, PP2, PP3)	да
10	м	53	<i>c.902G&gt;A, p.(Arg301Gln)</i>	0,42	6,94	миссен с	патогенный (PS3, PS4, PM3, PM1, PM2, PM5, PP1, PP2, PP3)	да
11	ж	66	<i>c.782del, p.(Gly261Valfs*8 )</i>	3,77	3,73	делеци я	патогенный (PVS1, PS3, PM1, PM2, PM3, PP1, PP2, PP3)	не описана
12	м	67	<i>c.644A&gt;G, p.(Asn215Ser)</i>	0,66	5,46	миссен с	патогенный (PS3, PM1, PM2, PM3, PP1, PP2, PP3)	да

Скрининговые программы диагностики БФ у женщин, включающие секвенирование по Сэнгеру, с успехом используются на протяжении многих лет, однако роль биохимической диагностики не теряет свою значимость и в настоящее время, поскольку позволяет определить истинное число пациентов с БФ среди пациентов, обладающих вариантами с неизвестным клиническим значением [136]. 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 пять женщин с аномальным значением лизо-Гб3, три женщины из числа

которых были с нормальной активностью  $\alpha$ -гал А. Пять пациентов со сниженной активностью фермента  $\alpha$ -гал А (трое мужчин и две женщины) имели повышенные значения лизо-ГБ3.

При этом у одной женщины с патогенным вариантом *c.967C>A* и нормальным значением  $\alpha$ -гал А значение концентрации лизо-ГБ3 составляло 2,05 нг/мл, что было близко к значению установленной нами ранее отрезной точки. Было принято решение об определении новой отрезной точки с помощью построения ROC-кривой соответствующей оптимальным параметрам чувствительности и специфичности. Наилучшее сочетание чувствительности и специфичности метода составило соответственно 100% и 100% лизо-ГБ3 при отрезной точке 2,02 нг/мл, что позволило перенести пациента в группу истинно положительных (рисунок 17).

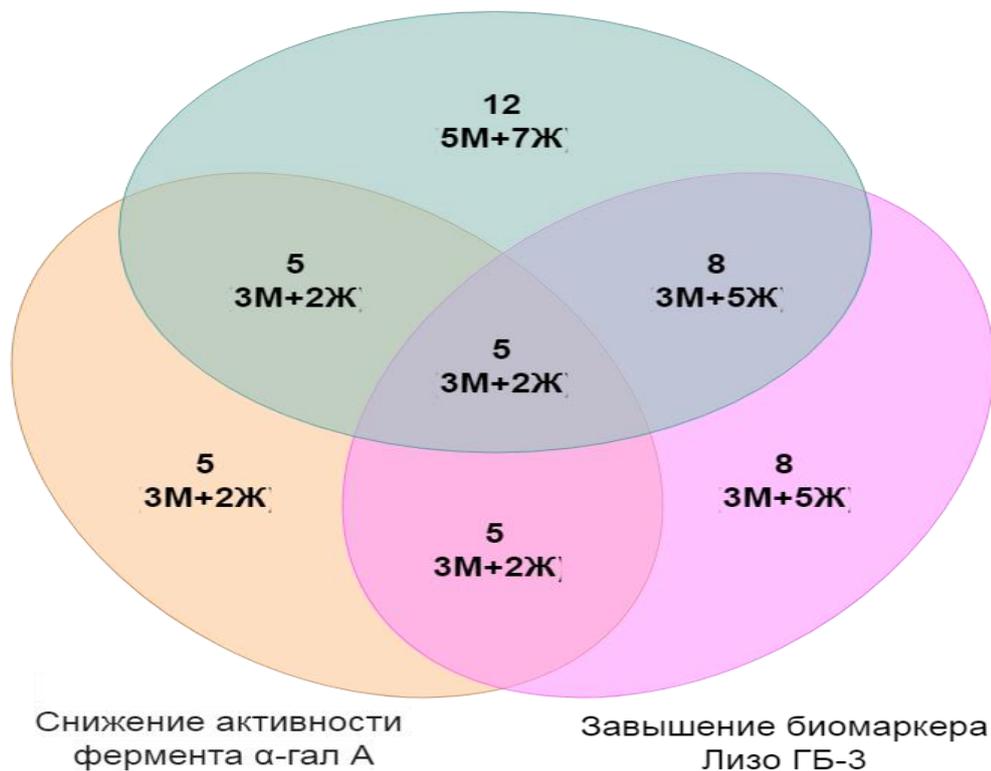


Рисунок 17 – Российские пациенты с атипичной формой БФ, проявляющиеся ГКМП, с изменениями активности фермента  $\alpha$ -гал А и концентрации лизо-ГБ3.

Кроме того, использование более строгих критериев отбора пациентов, таких как их минимальный возраст, составляющий не менее 40 лет, и др., может привести к увеличению выявляемости БФ в когорте кардиологических больных, ввиду единичных описаний гипертрофии миокарда у пациентов с БФ до третьего десятилетия жизни [75], а также доминантного механизма наследования, характерного для саркомерных ГКМП, однако наше исследование придерживалось задачи выявить реальный процент БФ среди взрослых российских пациентов с диагностированной ГКМП без дополнительных критериев отбора, искусственно завышающих выявляемость. Поэтому, мы считаем, что распространенность БФ в нашей когорте пациентов, вероятно, отражает истинную распространенность заболевания у российских пациентов с ГКМП.

В результате селективного скрининга 12256 пациентов с классической и атипичной формой болезни Фабри в гене *GLA* идентифицировано 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 5 (22%), 6 (22%) и 7 (26%), меньше всего было выявлено мутаций в 2 (6%) экзоне (рисунок 18).

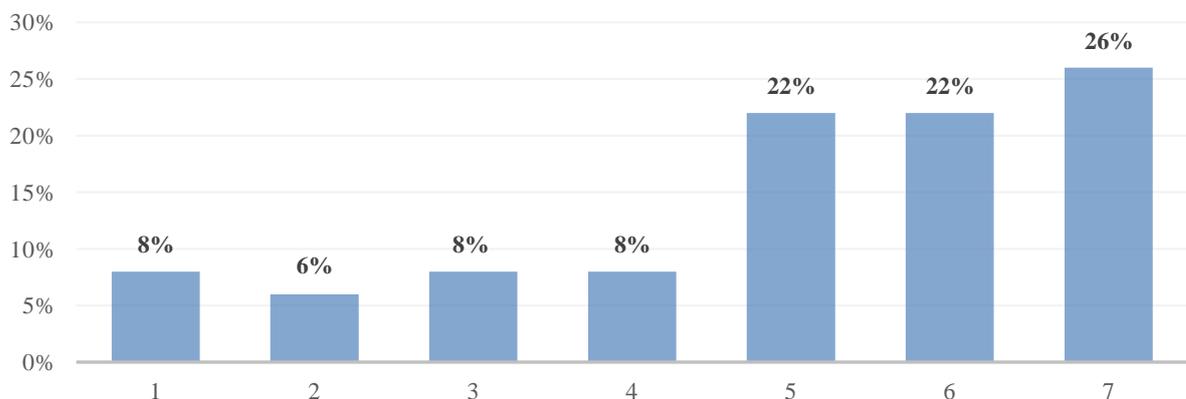


Рисунок 18 – Относительные частоты мутаций гена *GLA* в различных экзонах (1–7 – номера экзонов гена *GLA*), приводящих к развитию классической и атипичной формы БФ в РФ.

Молекулярное разнообразие 36 пробандов классической и атипичной формой БФ, выявленных в настоящем исследовании патогенных вариантов гена *GLA*, было характерно для всех 7 экзонов гена и представлены на рисунке 19.

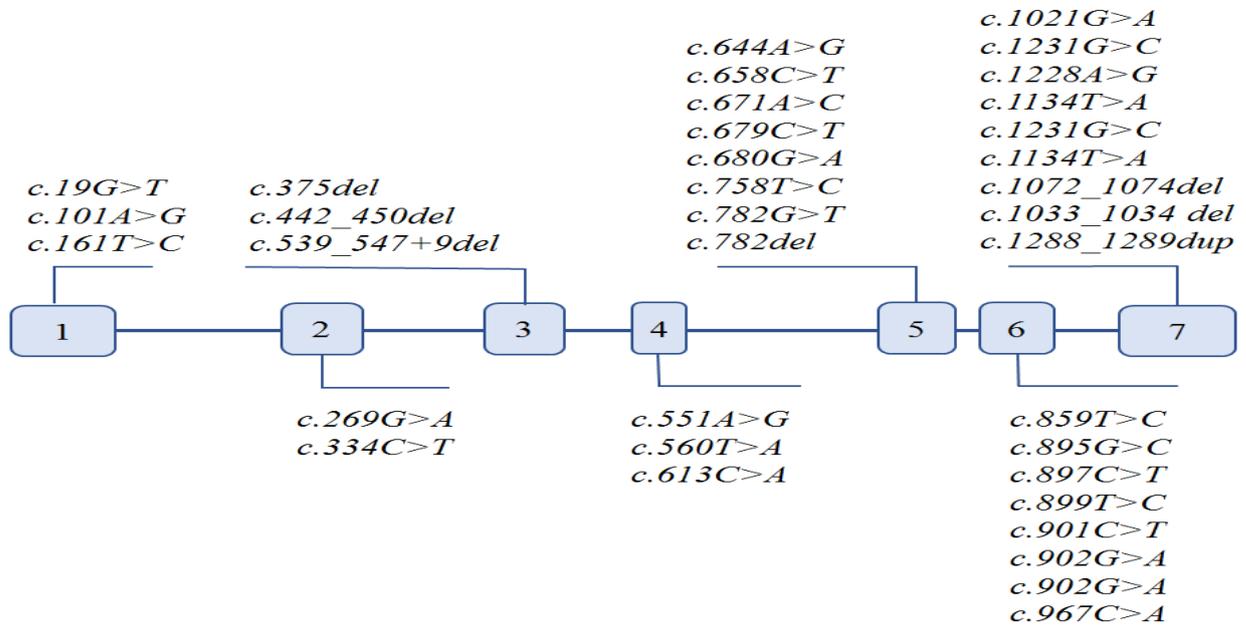


Рисунок 19 – Молекулярное разнообразие с классической и атипичной формой БФ выявленных мутаций в различных экзонах гена *GLA* (1–7 – номера экзонов гена *GLA*)

Среди всех найденных вариантов гена *GLA* в группе с классической формой и атипичной формой БФ большую часть 23(64%) составляют патогенные миссенс-варианты. В 5(14%) случаях выявлены различные делеции, которые расположены в 3, 5 и 7 экзонах. У 7(19%) пациентов обнаружены различные нонсенс мутации. Две мутации, приводящие к нарушению сайтов сплайсинга, были выявлены у 2(6%) пробандов. Выявлена 1(3%) дупликация *c.1288\_1289dup* у пробанда с ГКМП. Нонсенс мутация *c.1134T>A*, *p.(Cys378\*)*, миссенс-мутации *c.1231G>C*, *p.(Gly411Arg)* и *c.902G>A*, *p.(Arg301Gln)* выявлены дважды у пациентов из неродственных семей. Все (3/50%) новые небольшие патогенные делеции расположены в 3 экзоне. Распределение различных типов нуклеотидных вариантов гена *GLA*, выявленных в ходе проведенного нами селективного скрининга (рисунок 20).

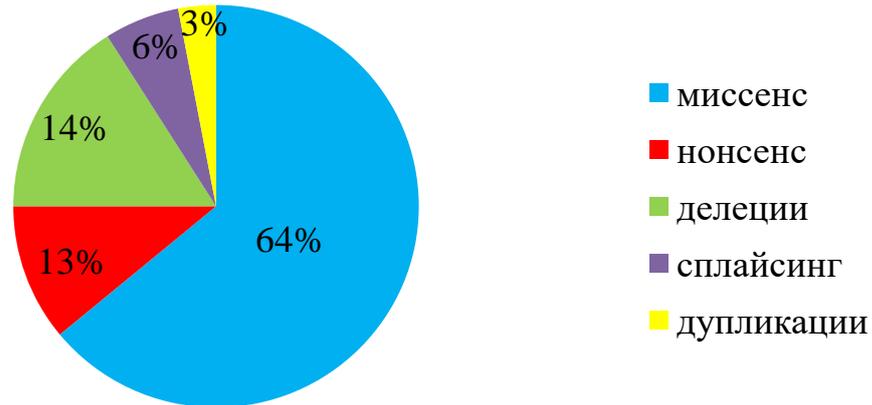


Рисунок 20 – Доли различных типов нуклеотидных вариантов гена *GLA*, обнаруженных в результате проведенного нами селективного скрининга с классической и атипичной формой БФ в РФ.

Молекулярное разнообразие патогенных мутаций гена *GLA* не аннотированных ранее в базе данных HGMD представлено 12 нуклеотидными вариантами: *c.269G>A*, *p.(Cys90Tyr)*; *c.551A>G*, *p.(Tyr184Cys)*; *c.560T>A*, *p.(Met187Lys)*; *c.895G>C*, *p.(Asp299His)*; *c.1134T>A*, *p.(Cys378\*)*; *c.1231G>C*, *p.(Gly411Arg)*; *c.442\_450del*, *p.(Ser148\_Gly150del)*; *c.375del*, *p.(His125Glnfs\*)*, *c.539\_547+9del*, *p.(Leu180\_Gly183delinsC)*. *c.1288\_1289dup*, *p.(Ter430TyrextTer?)*, *c.897C>A*, *p.(Asp299Gln)* и *c.644A>G*, *p.(Asn215Ser)*.

### 3.2. Характеристика группы пациентов с болезнью Фабри, выявленных в результате селективного скрининга

В результате проведенного нами двухэтапного селективного скрининга 10 300 пациентов с подозрением на классическую форму БФ было выявлено 28 человек, у которых имели место снижение активности фермента  $\alpha$ -гал А или завышение биомаркера лизо-Гб3. Соотношение полов мужского к женскому составило 8:1. Неравномерность распределения пациентов по полу связана с тем, что гетерозиготные женщины в большинстве случаев имеют

менее выраженные клинические проявления БФ по сравнению с гемизиготными мужчинами. Клинические проявления, на основании которых была заподозрена и подтверждена БФ, наблюдались в возрасте от 7 до 67 лет у мужчин (в среднем в 35,7 года) и в возрасте от 10 до 71 года – у женщин (в среднем 42,5 года) (таблица 11).

Таблица 11 – Общая характеристика больных с классической формой, выявленных в результате селективного скрининга

Параметр		Значение
Исследовано образцов, поступивших в лабораторию		10 300
Средний возраст (лет)		49,7±15,6 (7-71)
Выявлено пациентов при скрининге на БФ		28
Пол пациентов	мужской	22 (79%)
	женский	6 (21%)
Возраст пациентов (лет)	мужской	35,7 ± 3,4 (7-67)
	женский	42,5 ± 8,8 (10-71)

Распределение пациентов по возрастным группам на момент диагностики в результате скрининга пациентов с классической формой БФ, представлено на рисунке 21.

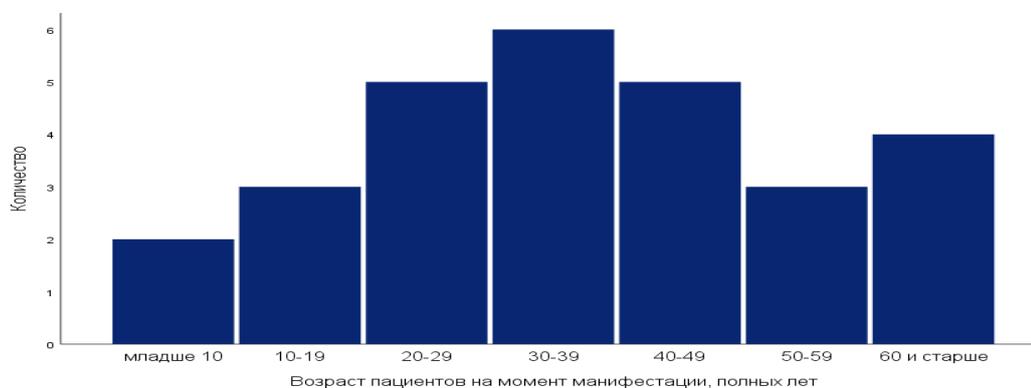


Рисунок 21 – Возраст пациентов на момент диагностики БФ

При анализе данных родословных 28 пробандов, выявленных при селективном скрининге с классической формы БФ, 10 из них (35,7%)

оказались единственными заболевшими в родословной. Глубина генеалогического поиска варьировала: от ядерной семьи до 3-х поколений родословного древа. Доля семейных случаев БФ в настоящем исследовании составила 64,3%. Диагноз БФ родственникам пробандов был поставлен на основании молекулярно-генетической верификации, проведенной методом секвенирования по Сэнгеру, патогенных вариантов гена *GLA*, выявленных у пробандов.

Общее число и молекулярные характеристики патогенных вариантов, выявленных в родословных пробандах с БФ представлено на рисунке 22.

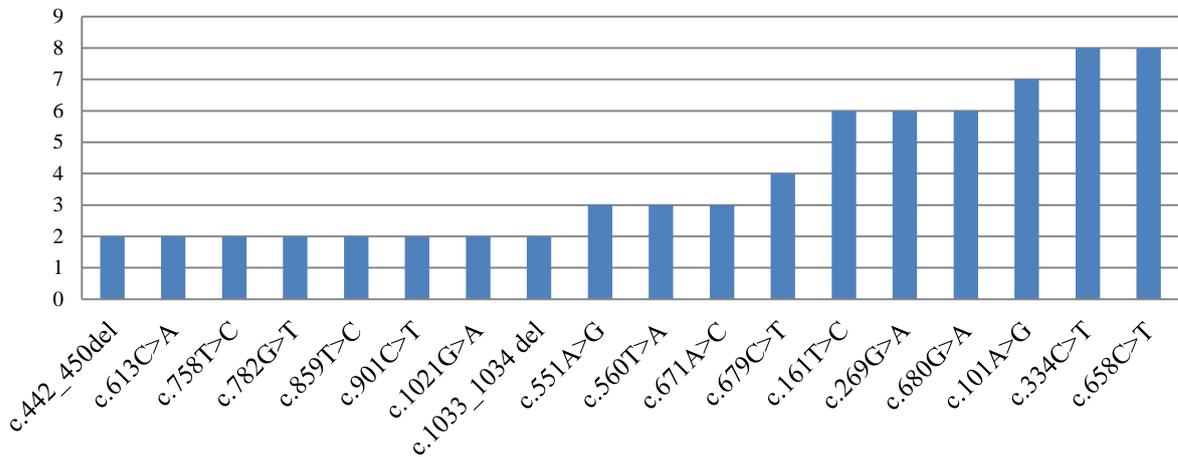


Рисунок 22 – Молекулярные характеристики патогенных вариантов и количество больных в каждой из 18 родословных (включая пробандов).

Рассмотрение данных представленного графика показывает, что общее число больных БФ среди всех родственников 18 пробандов, выявленных в рамках скрининга классической формой заболевания, составило 52 человека.

Таким образом, общее число всех больных БФ, выявленных по результатам скрининга классической формой заболевания и анализа семейной истории пробандов, в настоящем исследовании составило 80 человек.

Расчёты показывают, что в родословных с повторными случаями заболевания БФ в среднем выявлено по 4 поражённых родственников. Полученная оценка хорошо согласуется с данными, опубликованными ранее, но в два раза выше оценки, полученной в другом исследовании, проведенном в российской популяции [135].

Полученные результаты свидетельствуют, что последующее, за выявлением пробандов, обследование родственников, позволяет выявлять дополнительные случаи заболевания БФ, протекающих под маской других патологических состояний [63].

### 3.3. 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 23.



Рисунок 23. 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 12).

Таблица 12 – 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	39250960	2628	11(39,3)	0,42
Приволжский	29070827	1834	4(14,3)	0,22
Сибирский	17003027	1569	2(7,1)	0,13
Южный	16482488	1352	2(7,1)	0,15
Северо-Западный	13941959	945	4(14,3)	0,42
Уральский	123290	1422	2(7,1)	0,14
Северо-Кавказский	9967301	256	2(7,1)	0,78
Дальневосточный	8124053	294	1(3,6)	0,34
Всего:	146170115	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 рассмотреть распределение выявленных случаев БФ по субъектам Федеральных округов 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 низкой выявляемости БФ является недостаточность осведомленности врачей общей практики о первых, неспецифических клинических проявлениях такого редкого (орфанного) заболевания как БФ [63].

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 [126].

В связи с вышеизложенным, оценка распространенности БФ в Российской Федерации, рассчитанная по данным селективного скрининга в настоящее время далека от истинной.[59, 132].

### 3.4. Общая характеристика пациентов контрольной группы

Для определения значений отрезных точек и референсных интервалов для измерения активности фермента  $\alpha$ -гал А и концентрации субстрата лизо-Гб3 была создана контрольная группа из 100 здоровых индивидов от 10 до 60 лет без признаков БФ в соотношении мужского пола к женскому 3:1, средний возраст в группе составил  $38,34 \pm 17,06$ . Характеристика пациентов контрольной группы представлена в таблице 13.

Таблица 13 – Характеристика пациентов контрольной группы

Параметр		Значение
Число обследованных пациентов		100
Пол пациентов	мужской	74%
	женский	26%
Средний возраст в контрольной группе (95% ДИ), лет		$38,34 \pm 17,06$ (34,96–41,72)
Медиана активности $\alpha$ -гал А (min–max), мкмоль/л/ч		6,23 (2,45–19,20)
Медиана концентрации лизо-Гб3 (min–max), нг/мл		0,67 (0,20–1,94)

Представители, вошедшие в контрольную группу, не имели вредных привычек (курение табака, употребление алкоголя и наркотических средств), при обследовании группы не выявлено хронических заболеваний, у всех представителей контрольной группы не было родственников с БФ. Представители контрольной группы были обследованы специалистами, включая консультацию врача-генетика, психоневролога, кардиолога, нефролога, ортопеда, хирурга, окулиста и дерматолога. Инструментальное и биохимическое обследование пациентов из группы контроля состояло из УЗИ брюшной и грудной полости, ЭКГ сердца, общего анализа крови и мочи, определения активности фермента  $\alpha$ -гал А и концентрации субстрата

лизо-Гб3 в пятнах крови, высушенных на фильтровальной бумаге. Медиана концентрации субстрата лизо-Гб3 в контрольной группе составила 0,67 нг/мл. Медиана активности фермента  $\alpha$ -гал А в контрольной группе составила 6,23 мкмоль/литр/час.

### **3.5. Характеристика клинических проявлений пациентов с классической формой болезни Фабри**

Фенотипическая неоднородность проявлений БФ обуславливает обращаемость пациентов к специалистам разных специальностей. Диагностическая Одиссея, предшествующая постановке диагноза, проходила при консультировании врачей различных специальностей, число которых в отдельных случаях достигало десяти: терапевт (36/100%), кардиолог (33/92%), психоневролог (22/61%), ревматолог (19/53%), нефролог (17/47%), гастроэнтеролог (16/45%), дерматолог (15/42%), врач-генетик (14/39%), офтальмолог (13/36%) и эндокринолог (9/25%). Результаты нашего исследования сопоставимы с международными данными и показывают более частое консультирование пациентов терапевтом, кардиологом и психоневрологом (рисунок 24), что связано преимущественно с ухудшением общего состояния здоровья, манифестацией заболевания в виде сердечной недостаточности, гипертрофии левого желудочка сердца, фиброза миокарда, стенокардии и аритмии, нейропатических болей, кризов Фабри и ишемических инсультов [6].

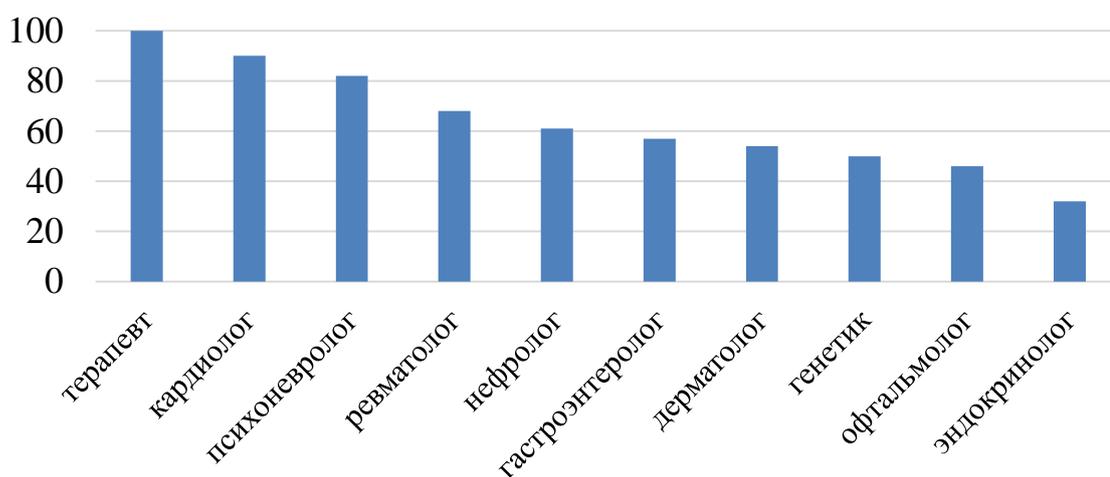


Рисунок 24 – Спектр специалистов, консультирующих пациентов с БФ до проведения лабораторной диагностики

У всех 28 пациентов с классической формой БФ, выявленных при селективном скрининге, проведен анализ фенотипических проявлений БФ. В 95% случаев пациентов мужского пола был отмечен классический фенотип БФ. Большинство пациентов (20/71%) демонстрировало манифестацию болезни на первом десятилетии жизни с акропарестезии (9/32%) и гипогидрозом (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. Акропарестезии, продолжающиеся от нескольких часов до суток, не снимались нестероидными анальгетиками. Для пациентов с выраженным болевым синдромом и склонностями к психоэмоциональным расстройствам необходимо оказание регулярной психологической помощи [24]. У многих пациентов с БФ (19/68%) отмечались гипогидроз или ангидроз в сочетании с уменьшением слюно- и

слезоотделения. Большинство пациентов с БФ (17/61%) имели сниженную функцию почек, микроальбминурию, с прогрессированием протеинурии и склероза почек. Желудочно-кишечными расстройствами страдали (16/57%) пациентов с БФ, 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 25.

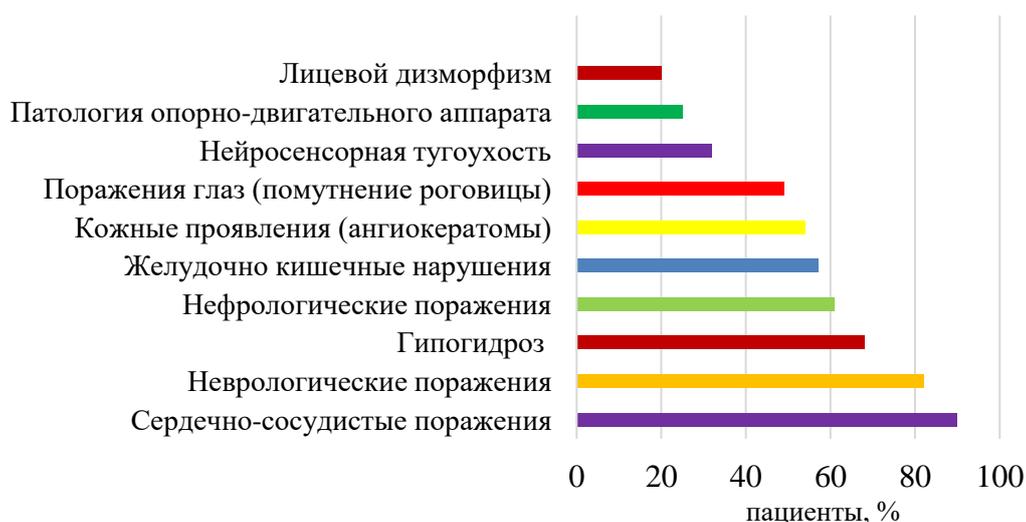


Рисунок 25 – Клинические проявления БФ у выявленных нами пациентов

Для мужчин с БФ характерны грубые черты лица (нависающий лоб, крупные нос и губы, выступающие супраорбитальные гребни), однако лицевой дизморфизм не может являться характерным признаком при постановке диагноза у лиц мужского пола. Так, в рассматриваемой выборке у (6/20%) пациентов отмечены грубые черты лица.

Для женщин с БФ характерна легкая форма течения болезни с более поздней манифестацией клинических проявлений и редким классическим фенотипом [82]. Периферическая полиневропатия отмечалась у (4/67%) выявленных в результате скрининга женщин, ангиокератомы у (3/50%) и гипогидроз у (4/67%), что в целом соответствует литературным данным [25].

У женщин с БФ также отмечались жалобы на повышенную утомляемость (5/83%), а также поражение сердца и сосудов (5/83%) и почечная недостаточность была у (4/67%).

### 3.6. Описание новых нуклеотидных вариантов гена *GLA*

Исследование, проведенное нами, позволило обнаружить и описать в соответствии с критериями патогенности (12/36,4%) новых вариантов гена *GLA* (таблица 14), не представленных ранее в базе данных HGMD, среди которых 6 миссенс мутаций и 4 делеции [133].

Таблица 14 – Описание патогенности новых нуклеотидных вариантов гена *GLA*

№ п/п	Новые мутации	Критерии патогенности*
1	<i>c.269G&gt;A, p.(Cys90Tyr)</i>	PS3, PM1, PM2, PM5, PP3, PP4, PP5
2	<i>c. 375del, p.(His125Glnfs*5)</i>	PVS1, PS3, PM1, PM2, PP4, PP5
3	<i>c.442_450del, p.(Ser148_Gly150del)</i>	PVS1, PS3, PM2, PP4
4	<i>c.539_547+9del, p.(Leu180_Gly183delinsC)</i>	PVS1, PS3, PM2, PP3, PP4
5	<i>c.551A&gt;G, p.(Tyr184Cys)</i>	PS3, PM1, PM2, PP3, PP4, PP5
6	<i>c.560T&gt;A, p.(Met187Lys)</i>	PS3, PM1, PM2, PM5, PP3, PP4, PP5
7	<i>c.782del, p.(Gly261Valfs*8)</i>	PVS1, PS3, PM1, PM2, PM3, PP1, PP2, PP3
8	<i>c.895G&gt;C, p.(Asp299His)</i>	PS3, PM1, PM2, PP3, PP4
9	<i>c.897C&gt;A, p.(Asp299Gln)</i>	PS3, PM1, PM2, PM5, PP2, PP3, PP5
10	<i>c.1134T&gt;A, p.(Cys378*)</i>	PVS1, PS3, PM1, PM2, PP4
11	<i>c.1231G&gt;C, p.(Gly411Arg)</i>	PS3, PM1, PM2, PP3, PP4
12	<i>c.1288_1289dup, p.(Ter430TyrextTer?)</i>	PS1, PS3, PM2, PM4

\* Согласно Российскому руководству по интерпретации данных нуклеотидной последовательности ДНК человека [10].

Такой высокий процент неописанных вариантов гена *GLA* указывает на высокую популяционную вариабельность в когорте российских пациентов с классической и атипичной формой БФ.

Выявленные 12 (36,4%) неописанных вариантов пополняют базу данных HGMD и составляют почти 1,0% всех описанных в ней вариантов гена *GLA*, вызывающих болезнь Фабри. Соотношение описанных ранее в базе HGMD патогенных вариантов гена *GLA* к не описанным вариантам показано на рисунке 26.

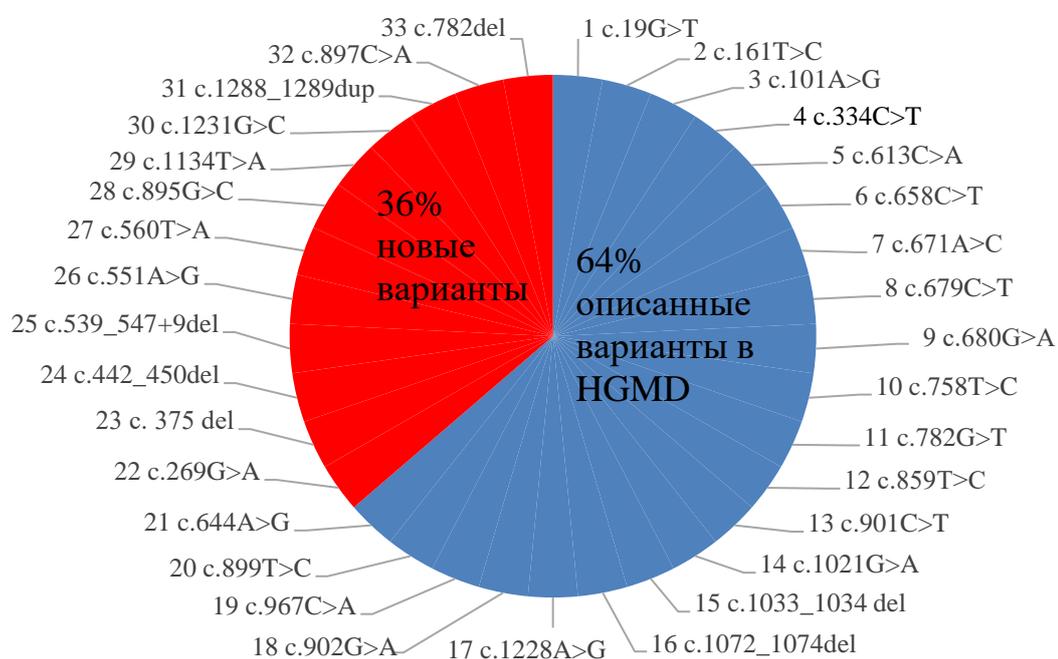


Рисунок 26 – Доли выявленных нами патогенных вариантов гена *GLA*, описанных и не описанных ранее в базе данных HGMD

Две миссенс мутация *c.1231G>C*, *p.(Gly411Arg)*, *c.902G>A*, *p.(Arg301Gln)* и одна нонсенс мутация *c.1134T>A*, *p.(Cys378\*)* мутация были обнаружены дважды у неродственных пациентов, однако их нельзя считать мажорными из-за немногочисленности выборки. Миссенс мутация *c.1231G>C*, *p.(Gly411Arg)* и нонсенс мутация *c.1134T>A*, *p.(Cys378\*)* выявлены повторно в группе с классической формой БФ. Миссенс мутация

*c.902G>A, p.(Arg301Gln)* была дважды выявлена в группе пациентов с ГКМП с атипичной формой БФ.

Клинические проявления в группе с атипичной формой развития БФ у 8 пациентов с патогенными вариантами гена *GLA* были недоступны для исследования.

Клинические проявления у 11 пациентов с патогенными вариантами гена *GLA* с классической формой БФ, которые не описаны в базе HGMD, приведены в таблице 15.

Таблица 15 – Клинические проявления БФ у пациентов с БФ, чьи мутации не описаны в базе HGMD

Нуклеотидный вариант	Аминокислотный вариант	Пол	Возраст (полных лет)	Лизо-Гб3	ССс/ГЖЛ	Инсульты	Неврологические	Гипогидроз	Протеинурии/ микроальбуминурии	ЖКТ (рвота/диарея)	Ангиокератомы	Кератопатии	Тугоухость	Акроарестезии
<i>c.269G&gt;A</i>	<i>p.(Cys90Tyr)</i>	м	7	60,4	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
<i>c.551A&gt;G</i>	<i>p.(Tyr184Cys)</i>	м	36	83,6	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+
<i>c.560T&gt;A</i>	<i>p.(Met187Lys)</i>	м	40	29,5	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
<i>c.895G&gt;C</i>	<i>p.(Asp299His)</i>	м	68	12,2	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+
<i>c.1134T&gt;A</i>	<i>p.(Cys378X)</i>	м	28	73,1	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>c.1231G&gt;C</i>	<i>p.(Gly411Arg)</i>	ж	10	3,5	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
<i>c.1134T&gt;A</i>	<i>p.Cys378X)</i>	м	30	60,0	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>c.1231G&gt;C</i>	<i>p.(Gly411Arg)</i>	м	40	35,0	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
<i>c.375 del</i>	<i>p.(His125Glnfs*5)</i>	ж	64	8,1	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>c.442_450del</i>	<i>p.(Ser148_Gly150 del)</i>	м	31	30,2	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>c.539_547+9 del</i>	<i>p.(Leu180_Gly183delinsC)</i>	м	27	15,0	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+

### 3.7. 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 16, медиана концентрации лизо-Гб3 у обследованных мужчин в 5 раз выше медианы концентрации лизо-Гб3 чем 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 16– Определение различий концентрации лизо-Гб3 в зависимости от пола пациентов

параметр	ПОЛ		р-значение
	мужчины	женщины	
Концентрация субстрата лизо-Гб3, нг/мл	33,1(18,0–44,4)	6,64(4,1–16,6)	0,009617

Концентрации лизо-Гб3 представлены значениями медианы и квартилями 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 [97].

Позднее в ряде публикаций сообщалось о повышенной частоте определённых патологических вариантов гена *GLA* у пациентов с инсультами [96].

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 17.

Таблица 17 – 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 (р-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 18 и 19).

Таблица 18 – 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 19 – 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.

### **3.8. Критерий контроля эффективности ферментозаместительной терапии**

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  $< 2,02$  нг/мл).

Это позволяет говорить о том, что критерием контроля эффективности применения ФЗТ терапии препаратом агалсидаза альфа может служить концентрация биомаркера лизо-Гб3 для пациентов с классической формой БФ, которая представлена в таблице 20 и рисунке 27.

Таблица 20 – Эффективность ФЗТ у пациентов с БФ

Пациенты БФ	Среднее значение Лизо-Гб3, нг/мл (норма $< 2,02$ нг/мл)		U – критерий Манна-Уитни ( $p=$ value)
	До ФЗТ	На ФЗТ	
Мужчины	31,38±9,8	6,02±2,2	$p=0,00007$
Женщины	5,36±2,03	3,08±0,7	$p=0,002$

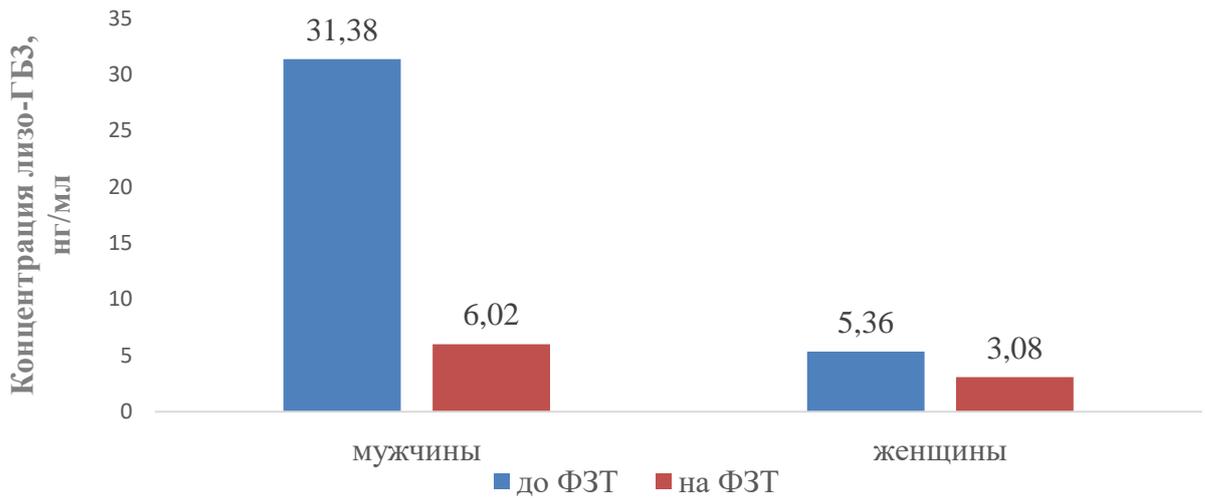


Рисунок 27 – Различия концентрации лизо-Гб3 у пациентов с классической формой БФ мужского и женского пола.

### 3.9. Клинико-генеалогические особенности болезни Фабри

Клинико-генеалогические особенности БФ представлены описанием одной семьи, 7 членов которой страдают БФ. При выявлении пробанда и при дальнейшем генеалогическом исследовании семьи, прослеживается распределение болезни в роду с указанием типа родственных связей [9].

#### III.4 – Мужчина ШЮВ 07.09.62 г.р. (пробанд)

Согласно семейному анамнезу, в 2018 году у пробанда III.4-ШЮВ, имеющего ХПН и получающего лечение гемодиализом, была заподозрена БФ. В результате биохимической диагностики было выявлено снижение активности фермента  $\alpha$ -гал А до 0,59 мкмоль/л/час (норма >1,98 мкмоль/л/час), концентрация биомаркера лизо-Гб3 составила 8,75 нг/мл (норма <2,10 нг/мл). Молекулярно-генетическое исследование, выполненное методом секвенирования по Сэнгеру, выявило мутацию гена *GLA* с.658C>T, p.Arg220\* в гемизиготном состоянии. Мутация описана ранее у пациентов с классической формой БФ [9, 88]. В возрасте 56 лет у пациента диагностировали БФ, что позволило предположить наличие данного заболевания у биологических родственников.

**III.2 – Женщина БЛА 02.09.68 г.р. (двоюродная сестра III.4-ШЮВ)**

III.2- БЛА, двоюродная сестра пациента III.4-ШЮВ с БФ, с 7 лет отмечает жжение в кистях и стопах, возникающее на жаре и при повышении температуры тела, а также пониженное потоотделение. С 40 лет стала обращать внимание на повышение артериального давления (АД) до 150/100 мм рт. ст. В возрасте 49 лет стала жаловаться на одышку и слабость, отмечать перебои в работе сердца (нарушение сердечного ритма по тахисистолическому варианту, в этом же возрасте выполнена радиочастотная абляция). В 50 лет при проведении биопсии пациентке установлен диагноз очаговый лимфогистиоцитарный миокардит. При обследовании выявлена микроальбуминурия с начальным снижением функции почек, кератопатия роговицы глаз, а также микроангиопатия на МРТ головного мозга. Диагноз БФ поставлен в 50 лет на основании исследования концентрации биомаркера лизо-Гб3 (26,8 нг/мл при норме <2,10 нг/мл); ферментативная активность  $\alpha$ -гал А была в норме (3,79 мкмоль/л/час при норме >1,98 мкмоль/л/час). Учитывая прогрессирующее течение заболевания, проявляющегося, прежде всего, поражением сердца, почек, центральной нервной системы пациентке назначена ФЗТ препаратом агалсидаза альфа пожизненно. (Данная терапия является единственным эффективным патогенетическим методом лечения больных с данной тяжелой наследственной патологией.) На фоне проводимого лечения у пациентки БЛА в 53 года значение биомаркера лизо-Гб3 существенно снизилось и составило 4,17 нг/мл (норма <2,10 нг/мл).

**IV.1 – Женщина МОА 14.03.1996 г.р. (дочь III.2-БЛА)**

У IV.1-МОА, дочери III.2-БЛА, в результате семейного скрининга выявлены снижение ферментативной активности  $\alpha$ -гал А (1,34 мкмоль/л/час при норме >1,98 мкмоль/л/час) и завышение концентрации биомаркера лизо-Гб3 (9,16 нг/мл при норме <2,10 нг/мл), а также обнаружен патогенный вариант *c.658C>T* гена *GLA*.

**III.3 – Женщина РЕА 11.04.77 г.р. (родная сестра III.2-БЛА)**

III.3-РЕА, родная сестра III.2-БЛА, с 5 лет отмечает жжение и боли в руках, непереносимость жары и физических нагрузок. В 26 лет перенесла инсульт, в результате которого проявились неврологические расстройства в виде нарушения речи. Периодически появляются эритематозные высыпания на нижних конечностях. Страдает ожирением 1-й степени (ИМТ 32,4 кг/м<sup>2</sup>), артериальной гипертензией II степени. В 42 года стала отмечать нарастание слабости, болей в суставах, кашля. Диагноз БФ был поставлен в 42 года на основании завышения концентрации биомаркера лизо-Гб3 (11,31 нг/мл при норме <2,10 нг/мл) и обнаружения мутации *c.658C>T* гена *GLA*. Учитывая прогрессирование заболевания, проявляющегося поражением органов и систем организма, пациентке назначена ФЗТ препаратом агалсидазы альфа пожизненно. На фоне проводимой ферментозаместительной терапии у пациентки РЕА в 43 года значение биомаркера лизо-Гб3 снизилось и составило 6,75 нг/мл (норма <2,10 нг/мл).

**IV.2 – Мужчина СГА 07.07.10 г.р. (сын III.2-РЕА)**

У СГА, сына РЕА, в результате семейного скрининга выявлена мутация гена *GLA c.658C>T* в гемизиготном состоянии. Пациенту были проведены лабораторные исследования, клинической картины проявлений симптомов БФ неизвестны.

**II.1 – Мужчина, (муж II.2 -КЕН), здоров.**

**II.2 – Женщина КЕН, 71 год (мать III.2-БЛА и III.3-РЕА)**

71-летняя женщина II.2-КЕН страдает нарушением мозгового кровообращения (в анамнезе повторные инсульты).

**II.3 – Мужчина, 45 лет (сибс II.2-КЕН)**

Родной брат II.2-КЕН, умерший в 45-летнем возрасте, с раннего возраста страдал ХПН и получал лечение гемодиализом.

**II.5 – Мужчина, (муж II.4-ШАН), здоров.**

Родственники первого поколения дожили до преклонного возраста и умерли к моменту исследования.

В результате семейного скрининга выявлена мутация гена *GLA* *c.658C>T, p.(Arg220\*)* у всех членов семьи. Родословная исследованной нами семьи с БФ приведена на рисунке 28.

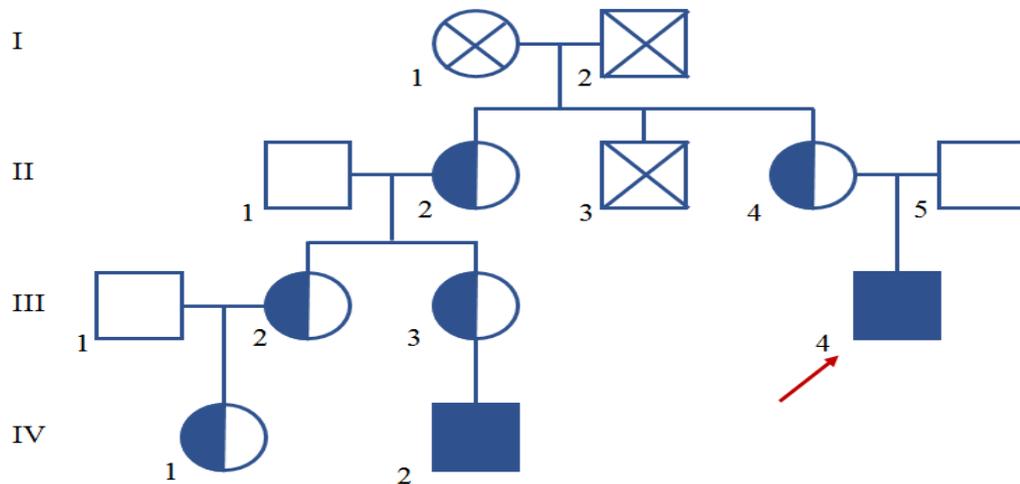


Рисунок 28 – Родословная семьи с болезнью Фабри, обладающей патогенным вариантом *c.658C>T, p.(Arg220X)* гена *GLA*

### 3.10. Оптимизация алгоритма клинико-лабораторной диагностики болезни Фабри

С целью облегчения клинической диагностики БФ и выявления пациентов с большей вероятностью наличия данного заболевания на основании собственного опыта работы и анализа литературных данных составлен алгоритм диагностики.

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-Гб3 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 29).



Рисунок 29 – Оптимизированный алгоритма диагностики пациентов с классической формой БФ

Впервые разработан алгоритм диагностики атипичной формы болезни Фабри у пациентов с ГКМП (рисунок 30).

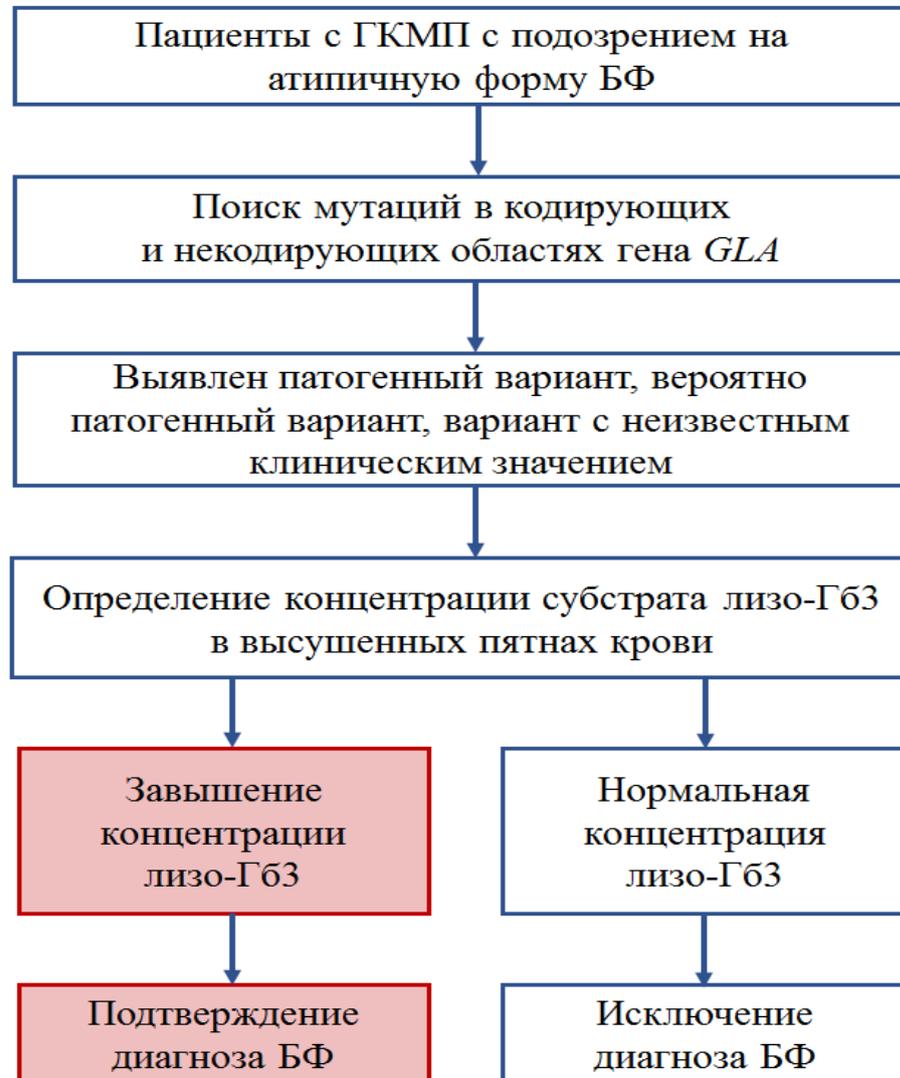


Рисунок 30 – Разработанный алгоритм диагностики БФ в качестве первичного теста определения биомаркера лизо-Гб3 у пациентов с атипичной формой БФ

Внедрение разработанного алгоритма позволит 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. Предложенный алгоритм позволит снизить временные, физические и психологические риски, а также уменьшить расходы и стать экономически выгодным для здравоохранения страны при селективном скрининге на БФ в российской популяции.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационное научное исследование включило в себя селективный скрининг БФ среди 12256 российских пациентов из групп высокого риска, что позволило определить спектр патогенных вариантов гена *GLA* и их относительные частоты, выявить новые мутации и определить корреляции генотипа и фенотипа, что явилось основанием для оптимизации существующего алгоритма диагностики БФ.

Двухступенчатый алгоритм диагностики БФ показывает эффективность лишь для мужчин, так как не все женщины с БФ демонстрируют снижение ферментативной активности. Это касается женщин с классической и в большей степени с атипичной формой БФ, клинические проявления которой ограничиваются ГКМП. Именно такие женщины, по нашим данным, могут демонстрировать нормальные либо пограничные значения  $\alpha$ -гал А. Поэтому в целях снижения ложноотрицательных результатов программ селективного скрининга БФ молекулярно-генетическая диагностика гена *GLA* рекомендуется в качестве теста первого уровня для женщин, подозрительных на БФ.

Кроме того, диссертационное исследование, продолжавшееся с 2017 по 2022 годы, позволило выявить у 36 пробандов 33 различных патогенных варианта гена *GLA*, 12 из которых описаны нами впервые в мире. Каждый из этих вариантов приводит к развитию определенной клинической картины, а определенные типы мутаций достоверно коррелируют с развитием различных осложнений БФ у их обладателей. Эти данные помогают свести к минимуму вероятность развития инсультов, инфарктов, тХПН, определяя прогноз и корректируя персонализированную терапию соответствующим образом. Также выявление первопричины развития БФ в каждом конкретном случае и ее связь с клиническими проявлениями представляет особый интерес для ученых, разрабатывающих новые средства

персонализированной терапии для пациентов с БФ, включая технологии редактирования генома, воздействующие на определенные патогенные варианты гена *GLA*.

Семейный анализ у 28 пациентов с классической формой БФ составил 80 человек, что в среднем выявил 3 родственника в 1 семье с БФ, что будет способствовать дальнейшим исследовательским процедурам пренатальной и преимплантационной диагностики, имеющим значимую профилактическую направленность по недопущению повторных случаев БФ в отягощенных семьях.

Выявляемость атипичной формы БФ среди российских пациентов с ГКМП обоих полов составила 0,41%, у классической формы БФ среди российских пациентов обоих полов составила 0,27%. Проведенная научная работа впервые подчеркнула преимущество высокопроизводительного секвенирования скрининга атипичной формы БФ у взрослых пациентов с ГКМП обоих полов, а также исследованных таргетных областей генома, включенных в панель, для параллельной диагностики первичных кардиомиопатий. Клиническое сходство между атипичной кардиологической формой БФ и саркомерными КМП предполагает, что ген *GLA*, наряду с саркомерными генами, должны анализироваться в совместных панелях, используемых для тестирования ГКМП, так как существующая терапия БФ предусматривает патогенетическую помощь пациентам с БФ, которая, в свою очередь, минимизирует риск развития инфаркта и внезапной сердечной смерти, увеличивая продолжительность жизни. При этом измерения активности  $\alpha$ -гал А и концентрации лизо-Гб3 необходимы для интерпретации клинической значимости выявленных генетических вариантов у конкретных пациентов с неизвестным клиническим значением.

## 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-ГбЗ, 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-ГбЗ 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-ГбЗ 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-ГбЗ у детей в неонатальном периоде, в том числе у детей с мутациями гена *GLA* из отягощенных 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 ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

A, T, G, C	–	азотистые основания: аденин, тимин, гуанин, цитозин соответственно
FDA	–	Food and Drug Administration
FWHM	–	Full Widht at Haif Maximum
FOS	–	Fabry Outcome Survey
GLA	–	$\alpha$ -галактозидаза А
HGMD	–	The Human Gene Mutation Database
NB-DNJ	–	N-бутилдеоксиноджиримицин
NCBI	–	National Center for Biotechnology Information
OMIM	–	электронный каталог менделирующих заболеваний человека (Online Mendelian Inheritance in Man)
PolyPhen	–	Polymorphism Phenotyping
ROC	–	рабочая характеристика приемника (Receiver operating characteristic)
SSIEM	–	Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism
$\alpha$ -гал А	–	фермент $\alpha$ -галактозидаза А
АД	–	аутосомно-доминантный тип наследования
АР	–	аутосомно-рецессивный тип наследования
БФ	–	болезнь Фабри
БГ	–	болезнь Гоше
ВЭЖХ–МС/МС	–	высокоэффективная жидкостная хроматография тандемной масс-спектрометрии
ВПС	–	Высокопроизводительное секвенирование
ВОЗ	–	Всемирная организация здравоохранения
Гб3	–	тригексозидцерамид
ГКМП	–	гипертрофическая кардиомиопатия
ГЛЖ	–	гипертрофия левого желудочка
ДНК	–	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДШ-БФ	–	диагностическая шкала вероятности диагноза болезни Фабри
ЖКТ	–	желудочно-кишечный тракт
иАПФ	–	ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента
КТ	–	компьютерная томография
Лизо-Гб3	–	фермент глоботриаозилсфингозин
ЛБН	–	лизосомные болезни накопления
ЛПВП	–	липопротеиды высокой плотности
ЛПНП	–	липопротеиды низкой плотности
ЛПОНП	–	липопротеины очень низкой плотности

МКБ	–	Международная классификация болезней 10-го пересмотра
МНН	–	Международное непатентованное название
МРС	–	магнитно-резонансная спектроскопия
МРТ	–	магнитно-резонансная томография
МТХ	–	митохондриальные заболевания
НБО	–	наследственные болезни обмена веществ
НПВС	–	нестероидные противовоспалительные средства
ОКР	–	обсессивно-компульсивное расстройство
ОНМК	–	острое нарушение мозгового кровообращения
ПААГ	–	полиакриламидный гель
ПДРФ-анализ	–	анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов
п.н.	–	пары нуклеотидов
п.о.	–	пара оснований
ПЦР	–	полимеразная цепная реакция
РНК	–	рибонуклеиновая кислота
РФ	–	Российская Федерация
СМГ	–	спленомегалия
СДГ	–	саккадические движения глаз
СРТ	–	субстратредуцирующая терапия
С-триол	–	холестан-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -триол
ТИА	–	транзиторная ишемическая атака
ТМС	–	тандемная масс-спектрометрия
тХПН	–	терминальная стадия хронической почечной недостаточности
УЗИ	–	ультразвуковое исследование
ФЗТ	–	ферментозаместительная терапия
ХБП	–	хроническая болезнь почек
ХПН	–	хроническая почечная недостаточность
ХТ	–	хитотриозидаза
ЦНС	–	центральная нервная система
ЦПХ	–	цитозольный переносчик холестерина
ЭДТА	–	этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭЭГ	–	электроэнцефалограмма
7-КС	–	7-кетохолестерин

Сокращения аминокислот в таблицах, рисунках и тексте даны в соответствии с рекомендациями международной номенклатурной комиссии.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Антонец А. В. Роль тандемной масс-спектрометрии в неонатальном скрининге наследственных болезней обмена веществ. Дисс. ...канд. мед. наук. ФГАОУ ВПО, Белгород, 2013.
2. Бююль А., Цефель П. SSPS: Искусство обработки информации. Анализ статистических данных и восстановление скрытых закономерностей // ДиаСофтЮп. 2005. С. 608.
3. Голивец Л. Т., Круглова О. В., Гусарова Е. А., Цыганова П. Г., Захарова Е. Ю. Селективный скрининг на болезнь Фабри // Медицинская генетика. 2014. № 12(150) (13). С. 29–34.
4. Кобринский Б. А. Континуум переходных состояний организма и мониторинг динамики здоровья детей / Б. А. Кобринский, 2016. 220 с.
5. Мазанова Н. Н., Пушков А. А., Пахомов А. В., Асанов А. Ю., Савостьянов К. В. Роль глоботриаозилсфингозина в диагностике болезни Фабри у российских пациентов // Медицинская генетика. 2020. № 7(216) (19). С. 81–82.
6. Мазанова Н. Н., Асанов А. Ю., Чебеляев И. Ю., Баканов М. И., Савостьянов К. . Современные представления о клинике, диагностике и терапии болезни Фабри. Обзор литературы // Медицинская генетика. 2021. № 7 (216). С. 3–13.
7. Мухин Н. А., Моисеев В. С., Моисеев С. В., Фомин В. В., Кобалава Ж. Д., Пулин А. . Диагностика и лечение болезни Фабри // Клиническая фармакология и терапия. 2013. № 2 (22). С. 1–12.
8. Пулин А. А., Фомин В. В., Бровко М. Ю., Бровко М. Ю., Гирина С. С. Трудности диагностики и лечения болезни Фабри // Клиническая фармакология. 2014. № 2 (23). С. 62–68.
9. Русакова А. А., Мазанова Н. Н., Пушков А. А., Савостьянов К. В. Семейный случай болезни Фабри 2022.С. 66–69.
10. Рыжкова О. П., Кардымон О. Л., Прохорчук Е. Б., Коновалов Ф. А.,

Масленников А. Б., Степанов В. А., Афанасьев А. А., Заклязьминская Е. В., Ребриков Д. В., Савостьянов К. В., Глотов А. С., Костарева А. А., Павлов А. Е., Голубенко М. В., Поляков А. В., Куцев С. И. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2) // Nauchno-prakticheskii zhurnal «Medicinskaia genetika». 2020. № 2(0). С. 3–23.

11. Савостьянов К. В. СОВРЕМЕННЫЕ АЛГОРИТМЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ РЕДКИХ НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ У РОССИЙСКИХ ПАЦИЕНТОВ / К. В. Савостьянов, под ред. А. П. ФИСЕНКО, А. В. Поляков, Москва: ООО «Полиграфист и издатель», 2022. 452 с.

12. Темин, П.А. К. Л. З. «Наследственные нарушения нервнопсихического развития детей // Медицина. 2001. С. 428.

13. Клинические рекомендации. Болезнь Фабри [Электронный ресурс]. URL: [https://www.pediatr-russia.ru/information/klin-rek/deystvuyushchie-klinicheskie-rekomendatsii/Болезнь Фабри КР 2020.pdf](https://www.pediatr-russia.ru/information/klin-rek/deystvuyushchie-klinicheskie-rekomendatsii/Болезнь_Фабри_КР_2020.pdf).

14. Adam M.P., Ardinger H.H. P. R. A. GeneReviews® [Internet] / M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon [et al.] (Eds.). – Seattle (WA): University of Washington, 1993–2020. – 2013 [updated Jan 5, 2017]. – Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1292/>.

15. Alfares A. A., Kelly M. A., McDermott G., Funke B. H., Lebo M. S., Baxter S. B., Shen J., McLaughlin H. M., Clark E. H., Babb L. J., Cox S. W., DePalma S. R., Ho C. Y., Seidman J. G., Seidman C. E., Rehm H. L. Results of clinical genetic testing of 2,912 probands with hypertrophic cardiomyopathy: expanded panels offer limited additional sensitivity // Genetics in Medicine. 2015. № 11 (17). С. 880–888.

16. Anderson W. A case of “angio-keratoma” // Br. J. Derm. 1898. С. 113–117.

17. Andrade J., Waters P. J., Singh R. S., Levin A., Toh B.-C., Vallance H. D., Sirrs S. Screening for Fabry Disease in Patients with Chronic Kidney Disease //

- Clinical Journal of the American Society of Nephrology. 2008. № 1 (3). C. 139–145.
18. Asuman Özkara H., Topçu M. Sphingolipidoses in Turkey // Brain and Development. 2004. № 6 (26). C. 363–366.
19. Balendran S., Oliva P., Sansen S., Mechtler T. P., Streubel B., Cobos P. N., Lukacs Z., Kasper D. C. Diagnostic strategy for females suspected of Fabry disease // Clinical Genetics. 2020. № 4 (97). C. 655–660.
20. Beck M., Ramaswami U., Hernberg-Ståhl E., Hughes D. A., Kampmann C., Mehta A. B., Nicholls K., Niu D.-M., Pintos-Morell G., Reisin R., West M. L., Schenk J., Anagnostopoulou C., Botha J., Giugliani R. Twenty years of the Fabry Outcome Survey (FOS): insights, achievements, and lessons learned from a global patient registry // Orphanet Journal of Rare Diseases. 2022. № 1 (17). C. 238.
21. Berná L, Asfaw B, Conzelmann E, Cerný B L. J. Determination of urinary sulfatides and other lipids by combination of reversed-phase and thin-layer chromatographies // Anal Biochem. 1999. (269). C. 304–11.
22. Bernstein H. S., Bishop D. F., Astrin K. H., Kornreich R., Eng C. M., Sakuraba H., Desnick R. J. Fabry disease: six gene rearrangements and an exonic point mutation in the alpha-galactosidase gene. // The Journal of clinical investigation. 1989. № 4 (83). C. 1390–9.
23. Bobillo Lobato J., Jiménez Hidalgo M., Jiménez Jiménez L. Biomarkers in Lysosomal Storage Diseases // Diseases. 2016. № 4 (4). C. 40.
24. Bolsover F. E. et al. Cognitive dysfunction and depression in Fabry disease: a systematic review // J Inherit Metab Dis. 2014. (37). C. 177–87.
25. Bouwman M.G, Saskia M Rombach, Erica Schenk, Annelies Sweeb, Frits A Wijburg, Carla E M Hollak G. E. L. Prevalence of symptoms in female Fabry disease patients: a case-control survey // J Inherit Metab Dis. 2012. (35). C. 891–8.
26. Brady R. O., Gal A. E., Bradley R. M., Martensson E., Warshaw A. L., Laster L. Enzymatic defect in Fabry's disease. Ceramidetrihexosidase deficiency. // The New England journal of medicine. 1967. № 21 (276). C. 1163–1167.
27. Brouns R, Thijs V E. F. et al. Belgian Fabry study: prevalence of Fabry disease

- in a cohort of 1000 young patients with cerebrovascular disease // *Stroke*. 2010. C. 863–8.
28. Burton B. K., Charrow J., Hoganson G. E., Waggoner D., Tinkle B., Braddock S. R., Schneider M., Grange D. K., Nash C., Shryock H., Barnett R., Shao R., Basheeruddin K., Dizikes G. Newborn Screening for Lysosomal Storage Disorders in Illinois: The Initial 15-Month Experience // *Journal of Pediatrics*. 2017. (190). C. 130–135.
29. Charrow J. A 14-year-old boy with pain in hands and feet. // *Pediatr Ann*. 2009. C. 190–192.
30. Chen S., Francioli L. C., Goodrich J. K., Collins R. L., Kanai M., Wang Q., Alföldi J., Watts N. A., Vittal C., Gauthier L. D., Poterba T., Wilson M. W., Tarasova Y., Phu W., Yohannes M. T., Koenig Z., Farjoun Y., Banks E., Donnelly S. [и др.]. Genome Aggregation Database (gnomAD). // *bioRxiv*. 2022. C. 2022.03.20.485034.
31. Colon C., Ortolano S., Melcon-Crespo C., Alvarez J. V., Lopez-Suarez O. E., Couce M. L., Fernández-Lorenzo J. R. Newborn screening for Fabry disease in the north-west of Spain // *European Journal of Pediatrics*. 2017. № 8 (176). C. 1075–1081.
32. Cox-Brinkman J., Vedder A., Hollak C., Richfield L., Mehta A., Orteu K., Wijburg F., Hammond P. Three-dimensional face shape in Fabry disease. // *European journal of human genetics : EJHG*. 2007. № 5 (15). C. 535–42.
33. DeRosa F., Smith L., Shen Y., Huang Y., Pan J., Xie H., Yahalom B., Heartlein M. W. Improved Efficacy in a Fabry Disease Model Using a Systemic mRNA Liver Depot System as Compared to Enzyme Replacement Therapy // *Molecular Therapy*. 2019. № 4 (27). C. 878–889.
34. Desnick R. J., Allen K. Y., Desnick S. J., Raman M. K., Bernlohr R. W., Krivit W. Fabry's disease: enzymatic diagnosis of hemizygotes and heterozygotes. Alpha-galactosidase activities in plasma, serum, urine, and leukocytes. // *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1973. № 2 (81). C. 157–71.
35. Desnick R. J. Prenatal diagnosis of Fabry disease // *Prenat Diagn*. 2007. (27). C.

693–4.

36. Doheny D., Srinivasan R., Pagant S., Chen B., Yasuda M., Desnick R. J. Fabry Disease: prevalence of affected males and heterozygotes with pathogenic GLA mutations identified by screening renal, cardiac and stroke clinics, 1995–2017 // *Journal of Medical Genetics*. 2018. № 4 (55). C. 261–268.
37. Dupont F.O., Gaqnon R. B. A metabolomic study reveals novel plasma lyso-Gb3 analogs as Fabry disease biomarkers. // *Curr. Med. Chem*. 2013. (20). C. 280–288.
38. Duro G., Zizzo C., Cammarata G., Burlina A., Burlina A., Polo G., Scalia S., Oliveri R., Sciarrino S., Francofonte D., Alessandro R., Pisani A., Palladino G., Napoletano R., Tenuta M., Masarone D., Limongelli G., Riccio E., Frustaci A. [и др.]. Mutations in the GLA Gene and LysoGb3: Is It Really Anderson-Fabry Disease? // *International Journal of Molecular Sciences*. 2018. № 12 (19). C. 3726.
39. Duvé C. De Exploring cells with a centrifuge // *Science*. 1975. № 4198 (189). C. 186–194.
40. Elleder M., Bradová V., Smíd F., Buděšínský M., Harzer K., Kustermann-Kuhn B., Ledvinová J., Bělohávek, Král V., Dorazilová V. Cardiocyte storage and hypertrophy as a sole manifestation of Fabry's disease // *Virchows Archiv A Pathological Anatomy and Histopathology*. 1990. № 5 (417). C. 449–455.
41. Elliott P., Baker R., Pasquale F., Quarta G., Ebrahim H., Mehta A. B., Hughes D. A. Prevalence of Anderson-Fabry disease in patients with hypertrophic cardiomyopathy: the European Anderson-Fabry Disease Survey // *Heart*. 2011. № 23 (97). C. 1957–1960.
42. Eng C. M., Germain D. P., Banikazemi M., Warnock D. G., Wanner C., Hopkin R. J., Bultas J., Lee P., Sims K., Brodie S. E., Pastores G. M., Strotmann J. M., Wilcox W. R. Fabry disease: Guidelines for the evaluation and management of multi-organ system involvement // *Genetics in Medicine*. 2006. T. 8. № 9. C. 539–548.
43. Fabry J Ein Beitrag zur Kenntnis der Purpura Haemorrhagica nodularis (Purpura papulosa haemorrhagica Hebrae). // *Archiv fur Dermatologie und*

syphilis. 1898. C. 187–200.

44. Fervenza F.C, Torra R L. D. J. Fabry disease: an underrecognized cause of proteinuria // *Kidney Int.* 2008. C. 1193–1199.

45. Germain D. P. Maladie de Fabry (déficit en alpha-galactosidase A) : Physiopathologie, signes cliniques et aspects génétiques // *Journal de la Société de Biologie.* 2002. № 2 (196). C. 161–173.

46. Germain D. P., Weidemann F., Abiose A., Patel M. R., Cizmarik M., Cole J. A., Beitner-Johnson D., Benistan K., Cabrera G., Charrow J., Kantola I., Linhart A., Nicholls K., Niemann M., Scott C. R., Sims K., Waldek S., Warnock D. G., Strotmann J. Analysis of left ventricular mass in untreated men and in men treated with agalsidase-β: data from the Fabry Registry // *Genetics in Medicine.* 2013. № 12 (15). C. 958–965.

47. Germain D. P., Elliott P. M., Falissard B., Fomin V. V., Hilz M. J., Jovanovic A., Kantola I., Linhart A., Mignani R., Namdar M., Nowak A., Oliveira J.-P., Pieroni M., Viana-Baptista M., Wanner C., Spada M. The effect of enzyme replacement therapy on clinical outcomes in male patients with Fabry disease: A systematic literature review by a European panel of experts // *Molecular Genetics and Metabolism Reports.* 2019. (19). C. 100454.

48. Germain D. P., Benistan K., Angelova L. X-linked inheritance and its implication in the diagnosis and management of female patients in Fabry disease // *Revue de Medecine Interne.* 2010. № SUPPL. 2 (31).

49. Griner P. F., Mayewski R. J., Mushlin A. I., Greenland P. Selection and interpretation of diagnostic tests and procedures. Principles and applications. // *Annals of internal medicine.* 1981. № 4 Pt 2 (94). C. 557–92.

50. Hauser A. C., Gessl A., Lorenz M., Voigtländer T., Födinger M., Sunder-Plassmann G. High prevalence of subclinical hypothyroidism in patients with Anderson–Fabry disease // *Journal of Inherited Metabolic Disease.* 2005. № 5 (28). C. 715–722.

51. Hauth L., Kerstens J., Yperzeele L., Eyskens F., Parizel P. M., Willekens B. Galactosidase Alpha p.A143T Variant Fabry Disease May Result in a Phenotype

With Multifocal Microvascular Cerebral Involvement at a Young Age // *Frontiers in Neurology*. 2018. (9).

52. Havndrup O., Christiansen M., Stoevring B., Jensen M., Hoffman-Bang J., Andersen P. S., Hasholt L., Nørremølle A., Feldt-Rasmussen U., Køber L., Bundgaard H. Fabry disease mimicking hypertrophic cardiomyopathy: genetic screening needed for establishing the diagnosis in women // *European Journal of Heart Failure*. 2010. № 6 (12). C. 535–540.

53. Heather, J.M., Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA // *Genomics*. 2016. (107). C. 1–8.

54. Hiroki Maruyama, Takuma Takata, Yutaka Tsubata R. T. et. a. Screening of male dialysis patients for fabry disease by plasma globotriaosylsphingosine // *Clin J Am Soc Nephrol*. 2013. C. 629–36.

55. Hoffmann B, Schwarz M, Mehta A K. S. Gastrointestinal symptoms in 342 patients with Fabry disease: prevalence and response to enzyme replacement therapy. // *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007. C. 1447–1453.

56. Høiseth A. Korrelasjon og regresjon // *Tidsskrift for Den norske legeforening*. 2018.

57. Hornbostel H. Das Angiokeratoma corporis diffusum universale mit kardiovaso-renalem Symptomenkomplex als neuartige Thesaurismoseform. // *Helvetica medica acta*. 1952. № 4–5 (19). C. 388–396.

58. Hughes D. A., Elliott P. M., Shah J., Zuckerman J., Coghlan G., Brookes J., Mehta A. B. Effects of enzyme replacement therapy on the cardiomyopathy of Anderson Fabry disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial of agalsidase alfa // *Heart*. 2008. № 2 (94). C. 153–158.

59. Hwu W.-L., Chien Y.-H., Lee N.-C., Chiang S.-C., Dobrovolny R., Huang A.-C., Yeh H.-Y., Chao M.-C., Lin S.-J., Kitagawa T., Desnick R. J., Hsu L.-W. Newborn screening for Fabry disease in Taiwan reveals a high incidence of the later-onset GLA mutation c.936+919G>A (IVS4+919G>A) // *Human Mutation*. 2009. № 10 (30). C. 1397–1405.

60. Ilyushkina A. A. I., Baydakova G. V. B., Bychkov I. O. B., Buruleva N. A. B.,

- Zakharova E. Y. Z. Selective screening for Fabry disease: review of literature data and experience in the Russian Federation // *Nephrology*. 2020. (2\_2020). C. 61–66.
61. Ishii S., Chang H.-H., Kawasaki K., Yasuda K., Wu H.-L., Garman S. C., Fan J.-Q. Mutant  $\alpha$ -galactosidase A enzymes identified in Fabry disease patients with residual enzyme activity: biochemical characterization and restoration of normal intracellular processing by 1-deoxygalactonojirimycin // *Biochemical Journal*. 2007. № 2 (406). C. 285–295.
62. Kampmann C., Linhart A., Baehner F., Palecek T., Wiethoff C. M., Miebach E., Whybra C., Gal A., Bultas J., Beck M. Onset and progression of the Anderson–Fabry disease related cardiomyopathy // *International Journal of Cardiology*. 2008. № 3 (130). C. 367–373.
63. Karovaikina E., Moiseev A., Bulanov N., Nosova N., Kuchieva A., Novikov P., Moiseev S. Screening, diagnosis and treatment of Fabry disease // *Clinical pharmacology and therapy*. 2019. № 3 (28). C. 68–74.
64. Kase R., Bierfreund U., Klein A., Kolter T., Utsumi K., Itoh K., Sandhoff K., Sakuraba H. Characterization of two  $\alpha$ -galactosidase mutants (Q279E and R301Q) found in an atypical variant of Fabry disease // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2000. № 2–3 (1501). C. 227–235.
65. Keating G. M. Agalsidase Alfa // *BioDrugs*. 2012. № 5 (26). C. 335–354.
66. Kim W.-S., Kim H. S., Shin J., Park J. C., Yoo H.-W., Takenaka T., Tei C. Prevalence of Fabry Disease in Korean Men with Left Ventricular Hypertrophy // *Journal of Korean Medical Science*. 2019. № 7 (34).
67. Kint J. A. The enzyme defect in fabry's disease // *Nature*. 1970. № 5263 (227). C. 1173.
68. Knol I.E., Ausems M.G. L. D. Different phenotypic expression in relatives with Fabry disease caused by a W226X mutation. *Am. J. Med. Genet.* 1999. (82). C. 436–439.
69. Kornreich R., Desnick R. J., Bishop D. F. Nucleotide sequence of the human  $\alpha$ -galactosidase a gene // *Nucleic Acids Research*. 1989. T. 17. № 8. C. 3301–3302.
70. Kotanko P., Kramar R., Devrnja D., Paschke E., Voigtländer T., Auinger M.,

- Pagliardini S., Spada M., Demmelbauer K., Lorenz M., Hauser A.-C., Kofler H.-J., Lhotta K., Neyer U., Pronai W., Wallner M., Wieser C., Wiesholzer M., Zodl H. [и др.]. Results of a nationwide screening for Anderson-Fabry disease among dialysis patients. // *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2004. № 5 (15). C. 1323–9.
71. Kramer J. W. F. Biomarkers for diagnosing and staging of Fabry disease. // *Current medicinal chemistry*. 2018. (25). C. 1530–7.
72. Lacombe D., Germain D. P., Papaxanthos-Roche A. Azoospermie : un nouveau signe d'appel de la maladie de Fabry // *La Revue de Médecine Interne*. 2010. (31). C. S214–S216.
73. Li Y., Scott R. C. N. A. Direct multiplex assay of lysosomal enzymes in dried blood spots for newborn screening // *Clinical Chemistry*. 2004. (50). C. 1785–1796.
74. Lin H.-Y., Chong K.-W., Hsu J.-H., Yu H.-C., Shih C.-C., Huang C.-H., Lin S.-J., Chen C.-H., Chiang C.-C., Ho H.-J., Lee P.-C., Kao C.-H., Cheng K.-H., Hsueh C., Niu D.-M. High Incidence of the Cardiac Variant of Fabry Disease Revealed by Newborn Screening in the Taiwan Chinese Population // *Circulation: Cardiovascular Genetics*. 2009. № 5 (2). C. 450–456.
75. Linhart A., Elliott P. M. The heart in Anderson-Fabry disease and other lysosomal storage disorders // *Heart*. 2007. № 4 (93). C. 528–535.
76. Linthorst G. E. Galactosidase A deficiency in Dutch patients on dialysis: a critical appraisal of screening for Fabry disease // *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2003. № 8 (18). C. 1581–1584.
77. Lukacs Z., Keil A., Peters V., Kohlschütter A., Hoffmann G. F., Cantz M., Kopitz J. Towards quality assurance in the determination of lysosomal enzymes: A two-centre study // *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2003. № 6 (26). C. 571–581.
78. Lukacs Z., Hartung R., Beck M., Keil A., Mengel E. Direct comparison of enzyme measurements from dried blood and leukocytes from male and female Fabry disease patients // *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2007. № 4 (30).

C. 614–614.

79. Lukas J., Scalia S. E. S. Functional and Clinical Consequences of Novel  $\alpha$ -Galactosidase A Mutations in Fabry Disease // *Hum Mutat.* 2016. (37). C. 43–51.
80. Lukas J., Giese A.-K., Markoff A., Grittner U., Kolodny E., Mascher H., Lackner K. J., Meyer W., Wree P., Saviouk V., Rolfs A. Functional Characterisation of Alpha-Galactosidase A Mutations as a Basis for a New Classification System in Fabry Disease // *PLoS Genetics.* 2013. № 8 (9). C. e1003632.
81. MacDermot K. D., Holmes A., Miners A. H. Anderson-Fabry disease: Clinical manifestations and impact of disease in a cohort of 60 obligate carrier females [1] // *Journal of Medical Genetics.* 2001. T. 38. № 11. C. 769–775.
82. MacDermot K. D., Holmes A., Miners A. H. Anderson-Fabry disease: Clinical manifestations and impact of disease in a cohort of 98 hemizygous males // *Journal of Medical Genetics.* 2001. № 11 (38). C. 750–760.
83. Magage S., Lubanda J. C., Susa Z., Bultas J., Karetová D., Dobrovolný R., Hřebíček M., Germain D. P., Linhart A. Natural history of the respiratory involvement in Anderson-Fabry disease // *Journal of Inherited Metabolic Disease.* 2007. № 5 (30). C. 790–799.
84. Marian A. J., Rooij E. van, Roberts R. Genetics and Genomics of Single-Gene Cardiovascular Diseases // *Journal of the American College of Cardiology.* 2016. № 25 (68). C. 2831–2849.
85. Maruyama H., Miyata K. M. M. Correction: Effectiveness of plasma lyso-Gb3 as a biomarker for selecting high-risk patients with Fabry disease from multispecialty clinics for genetic analysis. // *Genet. Med.* 2019. (21). C. 1263.
86. Mazzarotto F., Olivotto I., Boschi B., Girolami F., Poggesi C., Barton P. J. R., Walsh R. Contemporary Insights Into the Genetics of Hypertrophic Cardiomyopathy: Toward a New Era in Clinical Testing? // *Journal of the American Heart Association.* 2020. № 8 (9).
87. McCluer R. H., Ullman M. D., Jungalwala F. B. [30] High-performance liquid chromatography of membrane lipids: Glycosphingolipids and phospholipids

1989.C. 538–575.

88. Meaney C., Blanch L. C., Morris C. P. A nonsense mutation (R220X) in the  $\alpha$ -galactosidase A gene detected in a female carrier of Fabry disease // *Human Molecular Genetics*. 1994. № 6 (3). C. 1019–1020.

89. Mechtler T. P., Stary S., Metz T. F., Jesús V. R. De, Greber-Platzer S., Pollak A., Herkner K. R., Streubel B., Kasper D. C. Neonatal screening for lysosomal storage disorders: feasibility and incidence from a nationwide study in Austria. // *Lancet* (London, England). 2012. № 9813 (379). C. 335–41.

90. Mehta A., Ricci R., Widmer U., Dehout F., Garcia De Lorenzo A., Kampmann C., Linhart A., Sunder-Plassmann G., Ries M., Beck M. Fabry disease defined: Baseline clinical manifestations of 366 patients in the Fabry Outcome Survey // *European Journal of Clinical Investigation*. 2004. № 3 (34). C. 236–242.

91. Meikle P. J., Hopwood J. J., Clague A. E., Carey W. F. Prevalence of lysosomal storage disorders // *Journal of the American Medical Association*. 1999. № 3 (281). C. 249–254.

92. Merchesoni C.L., Roa N. P. . M. et al. Misdiagnosis in Fabry disease // *J. Pediatr*. 2010. (156). C. 828–831.

93. Mersebach H., Johansson J.-O., Rasmussen åse krogh, Bengtsson B.-Å., Rosenberg K., Hasholt L., Sørensen S. A., Sørensen S. schwartz, Feldt-Rasmussen U. Osteopenia: a common aspect of Fabry disease. Predictors of bone mineral density // *Genetics in Medicine*. 2007. № 12 (9). C. 812–818.

94. Merta M, Reiterova J, Ledvinova J et al. A nationwide blood spot screening study for Fabry disease in the Czech Republic haemodialysis patient population. // *Nephrol Dial Transplant*. 2007. C. 179–86.

95. Moiseev S., Fomin V., Savostyanov K., Pushkov A., Moiseev A., Svistunov A., Namazova-Baranova L., Sergey Moiseev, Victor Fomin K. S. et. al. The Prevalence and Clinical Features of Fabry Disease in Hemodialysis Patients: Russian Nationwide Fabry Dialysis Screening Program. // *Clin Pract*. 2019. № 4 (141). C. 249–255.

96. Nagamatsu K., Sekijima Y., Nakamura K., Nakamura K., Hattori K., Ota M.,

- Shimizu Y., Endo F., Ikeda S. Prevalence of Fabry disease and GLA c.196G>C variant in Japanese stroke patients // *Journal of Human Genetics*. 2017. № 7 (62). C. 665–670.
97. Nakamura K., Sekijima Y., Nakamura K., Hattori K., Nagamatsu K., Shimizu Y., Yazaki M., Sakurai A., Endo F., Fukushima Y., Ikeda S. -I. p.E66Q mutation in the GLA gene is associated with a high risk of cerebral small-vessel occlusion in elderly Japanese males. // *European journal of neurology*. 2014. № 1 (21). C. 49–56.
98. Nakao S., Kodama C., Takenaka T., Tanaka A., Yasumoto Y., Yoshida A., Kanzaki T., Enriquez A. L. D., Eng C. M., Tanaka H., Tei C., Desnick R. J. Fabry disease: Detection of undiagnosed hemodialysis patients and identification of a «renal variant» phenotype // *Kidney International*. 2003. № 3 (64). C. 801–807.
99. Namazova-Baranova L. S., Baranov A. A., Pushkov A. A., Savostyanov K. V. Fabry disease in children: a federal screening programme in Russia // *European Journal of Pediatrics*. 2017. № 10 (176). C. 1385–1391.
100. Niemann M., Rolfs A., Störk S., Bijnens B., Breunig F., Beer M., Ertl G., Wanner C., Weidemann F. Gene Mutations Versus Clinically Relevant Phenotypes // *Circulation: Cardiovascular Genetics*. 2014. № 1 (7). C. 8–16.
101. Oliveira JP, Valbuena C B. M. A. Splenomegaly, hypersplenism and peripheral blood cytopaenias in patients with classical Anderson-Fabry disease. // *Virchows Arch*. 2008. C. 291–300.
102. Oliveira JP F. S. Multiple phenotypic domains of Fabry disease and their relevance for establishing genotype– phenotype correlations // *Appl Clin Genet*. 2019. C. 35–50.
103. Orssaud C., Dufier J. L., Germain D. P. Ocular manifestations in Fabry disease: a survey of 32 hemizygous male patients // *Ophthalmic Genetics*. 2003. № 3 (24). C. 129–139.
104. Ortiz A., Germain D. P., Desnick R. J., Politei J., Mauer M., Burlina A., Eng C., Hopkin R. J., Laney D., Linhart A., Waldek S., Wallace E., Weidemann F., Wilcox W. R. Fabry disease revisited: Management and treatment

- recommendations for adult patients // *Molecular Genetics and Metabolism*. 2018. T. 123. № 4. C. 416–427.
105. Paulo Gaspar, Julio Herrera D. R. et al. Frequency of Fabry disease in male and female haemodialysis patients in Spain. // *BMC Med Genet*. 2010. C. 19.
106. Peterschmitt MJ, Crawford NPS, Gaemers SJM et al. Peterschmitt MJ, Crawford NPS, Gaemers SJM, et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and tolerability of oral venglustat in healthy volunteers. 2021. (10). C. 86–98.
107. Pieroni M., Moon J. C., Arbustini E., Barriales-Villa R., Camporeale A., Vujkovic A. C., Elliott P. M., Hagege A., Kuusisto J., Linhart A., Nordbeck P., Olivotto I., Pietilä-Effati P., Namdar M. Cardiac Involvement in Fabry Disease // *Journal of the American College of Cardiology*. 2021. № 7 (77). C. 922–936.
108. Pinto R., Caseiro C., Lemos M., Lopes L., Fontes A., Ribeiro H., Pinto E., Silva E., Rocha S., Marcão A., Ribeiro I., Lacerda L., Ribeiro G., Amaral O., Sá Miranda M. C. Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal // *European Journal of Human Genetics*. 2004. № 2 (12). C. 87–92.
109. Pisani A., Spinelli L. V. B. et al. Effects of switching from agalsidase beta to agalsidase alfa in 10 patients with Anderson-Fabry disease // *JIMD Rep*. 2013. C. 41–48.
110. POMPEN A. W. M., RUITER M., WYERS H. J. G. Angiokeratoma corporis diffusum (universale) Fabry, as a sign of an unknown internal disease; two autopsy reports. // *Acta Medica Scandinavica*. 2009. № 3 (128). C. 234–255.
111. Poorthuis B. J. H. M., Wevers R. A., Kleijer W. J., Groener J. E. M., Jong J. G. N. De, Weely S. Van, Niezen-Koning K. E., Diggelen O. P. Van The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands // *Human Genetics*. 1999. № 1–2 (105). C. 151–156.
112. Porsch D. B., Nunes A. C. M. V. et al. Fabry disease in hemodialysis patients in southern Brazil: prevalence study and clinical report. // *Ren. Fail*. 2008. (30). C. 825–830.
113. Ramaswami U., Whybra C., Parini R., Pintos-Morell G., Mehta A., Sunder-Plassmann G., Widmer U., Beck M. Clinical manifestations of Fabry disease in

- children: Data from the Fabry Outcome Survey // *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics*. 2006. № 1 (95). C. 86–92.
114. Reinhold B.B C. S.-Y. Profiling glycosphingolipid structural detail: Periodate oxidation, electrospray, collision-induced dissociation and tandem mass spectrometry // *Organic Mass. Spectrom.* 1994. (29). C. 736–746.
115. Ries M, Gupta S M. D. Pediatric Fabry disease. // *Pediatrics*. 2005. C. 344–355.
116. Ries M. G. A. Genotype–phenotype correlation in Fabry disease. *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*. Oxford: Oxford PharmaGenesis / G. A. Ries M., 2006. Chapter 34 c.
117. Rocchetti M. T., Spadaccino F., Catalano V., Zaza G., Stallone G., Fiocco D., Netti G. S., Ranieri E. Metabolic Fingerprinting of Fabry Disease: Diagnostic and Prognostic Aspects // *Metabolites*. 2022. № 8 (12). C. 703.
118. Rost NS, Cloonan L, Kanakis AS, Filzpatrick KM, Azzariti DK C. V Determinants of white matter hyperintensity burden in patients with Fabry disease. // *Neurology*. 2016. C. 1880–6.
119. Sakuraba H, Murata-Ohsawa M K. I. et al. Comparison of the effects of agalsidase alfa and agalsidase beta on cultured human Fabry fibroblasts and Fabry mice // *J Hum Genet*. 2006. C. 180–188.
120. Sakuraba H, Togawa T T. T. Plasma lyso-Gb3: a biomarker for monitoring Fabry patients during enzyme replacement therapy. // *Clin Exp Nephrol*. 2018. (22). C. 843–9.
121. Sakuraba H., Tsukimura T., Togawa T., Tanaka T., Ohtsuka T., Sato A., Shiga T., Saito S., Ohno K. Fabry disease in a Japanese population-molecular and biochemical characteristics. // *Molecular genetics and metabolism reports*. 2018. (17). C. 73–79.
122. Savostyanov K., Pushkov A., Mazanova N. Lyso-gb3 is as a primary biomarker for fabry disease screening among high-risk contingents. // *Molecular Genetics and Metabolism*. 2019. № 2 (146). C. S130–S131.
123. Savostyanov K. V., Namazova-Baranova L. S., Basargina E. N.,

- Vashakmadze N. D., Zhurkova N. V., Pushkov A. A., Zhanin I. S., Sdvigova N. A., Lukanina V. Y., Nikitin A. THE NEW GENOME VARIANTS IN RUSSIAN CHILDREN WITH GENETICALLY DETERMINED CARDIOMYOPATHIES REVEALED WITH MASSIVE PARALLEL SEQUENCING // *Annals of the Russian academy of medical sciences*. 2017. № 4 (72). C. 242–253.
124. Schiffmann R. Neuropathy and Fabry disease: pathogenesis and enzyme replacement therapy. // *Acta Neurol Belg*. 2006. C. 61–5.
125. Schiffmann R., Warnock D. G., Banikazemi M., Bultas J., Linthorst G. E., Packman S., Sorensen S. A., Wilcox W. R., Desnick R. J. Fabry disease: Progression of nephropathy, and prevalence of cardiac and cerebrovascular events before enzyme replacement therapy // *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2009. № 7 (24). C. 2102–2111.
126. Schiffmann R., Hughes D. A., Linthorst G. E., Ortiz A., Svarstad E., Warnock D. G., West M. L., Wanner C., Bichet D. G., Christensen E. I., Correa-Rotter R., Elliott P. M., Feriozzi S., Fogo A. B., Germain D. P., Hollak C. E. M., Hopkin R. J., Johnson J., Kantola I. [и др.]. Screening, diagnosis, and management of patients with Fabry disease: conclusions from a “Kidney Disease: Improving Global Outcomes” (KDIGO) Controversies Conference // *Kidney International*. 2017. № 2 (91). C. 284–293.
127. Schiffmann R., Goker-Alpan O., Holida M., Giraldo P., Barisoni L., Colvin R. B., Jennette C. J., Maegawa G., Boyadjiev S. A., Gonzalez D., Nicholls K., Tuffaha A., Atta M. G., Rup B., Charney M. R., Paz A., Szlaifer M., Alon S., Brill-Almon E. [и др.]. Pegunigalsidase alfa, a novel PEGylated enzyme replacement therapy for Fabry disease, provides sustained plasma concentrations and favorable pharmacodynamics: A 1-year Phase 1/2 clinical trial // *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2019. (42). C. jimd.12080.
128. Scott C.R., Elliott S. B. N. . Identification of Infants at Risk for Developing Fabry, Pompe, or Mucopolysaccharidosis-I from Newborn Blood Spots by Tandem Mass Spectrometry. // *J Pediatr*. 2013. (163). C. 498–503.
129. Shin S. H., Kluepfel-Stahl S., Cooney A. M., Kaniski C. R., Quirk J. M.,

- Schiffmann R., Brady R. O., Murray G. J. Prediction of response of mutated alpha-galactosidase A to a pharmacological chaperone // *Pharmacogenetics and Genomics*. 2008. № 9 (18). C. 773–780.
130. Sims K., Politei J., Banikazemi M., Lee P. Stroke in fabry disease frequently occurs before diagnosis and in the absence of other clinical events: Natural history data from the Fabry registry // *Stroke*. 2009. № 3 (40). C. 788–794.
131. Sodi A, Ioannidis AS M. A. Ocular manifestations of Fabry's disease: data from the Fabry Outcome Survey. // *Br J Ophthalmol*. 2007. C. 210–214.
132. Spada M., Pagliardini S., Yasuda M., Tukul T., Thiagarajan G., Sakuraba H., Ponzone A., Desnick R. J. High incidence of later-onset Fabry disease revealed by newborn screening // *American Journal of Human Genetics*. 2006. № 1 (79). C. 31–40.
133. Sue R. N. A. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Richards+S&cau> // *Genet Med*. 2015. (17). C. 405–425.
134. Sweeley C. C., Klionsky B. Fabry's Disease: Classification as a Sphingolipidosis and Partial Characterization of a Novel Glycolipid. // *The Journal of biological chemistry*. 1963. № 9 (238). C. PC3148–PC3150.
135. Tao E., Moiseev A., Novikov P., Bulanov N., Nosova N., Moiseev S. Efficacy of family screening in Fabry disease in the Russian population // *Clinical pharmacology and therapy*. 2020. № 2 (29). C. 34–39.
136. Tol L. van der, Smid B. E., Poorthuis B. J., Smid B. E., Poorthuis B. J. H. M., Biegstraaten M., Deprez R. H. L., Linthorst G. E., Hollak C. E. M. A systematic review on screening for Fabry disease: prevalence of individuals with genetic variants of unknown significance // *Journal of Medical Genetics*. 2014. № 1 (51). C. 1–9.
137. Valtola K., Nino-Quintero J., Hedman M., Lottonen-Raikaslehto L., Laitinen T., Maria M., Kantola I., Naukkarinen A., Laakso M., Kuusisto J. Cardiomyopathy

- associated with the Ala143Thr variant of the  $\alpha$ -galactosidase A gene // Heart. 2020. № 8 (106). C. 609–615.
138. Vance D. E. S. C. C. Quantitative determination of the neutral glycosyl ceramides in human blood // J. Lipid. Res. 1967. (8). C. 621–630.
139. Varela-Calais P., Nicolicht P., Paulo Martin R., Yamamoto J., D'Almeida V., Martins A. M., Pesquero J. B. Functional characterization of novel variants found in patients with suspected Fabry disease. // Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry. 2022. (534). C. 156–160.
140. Veen S. J. van der, Hollak C. E. M., Kuilenburg A. B. P. van, Langeveld M. Developments in the treatment of Fabry disease // Journal of Inherited Metabolic Disease. 2020. T. 43. № 5. C. 908–921.
141. Waldek S, Patel M.R B. M. et al. Life expectancy and cause of death in males and females with Fabry disease findings from the Fabry Registry // Genetics in Medicine. 2009. (11). C. 790–796.
142. Wang R. Y., Lelis A., Mirocha J., Wilcox W. R., Raymond Y Wang 1, Alicia Lelis, James Mirocha W. R. W. Heterozygous Fabry women are not just carriers, but have a significant burden of disease and impaired quality of life // Genetics in Medicine. 2007. T. 9. № 1. C. 34–45.
143. Wise D., Wallace H. J., Jellinek E. H. Angiokeratoma corporis diffusum. A clinical study of eight affected families. // The Quarterly journal of medicine. 1962. (31). C. 177–206.
144. Wittmann J, Karg E T. S. Newborn Screening for Lysosomal Storage Disorders in Hungary. // JIMD Rep. 2012. (6). C. 117–125.
145. Wu X., Katz E., Valle M. C. Della, Mascioli K., Flanagan J. J., Castelli J. P., Schiffmann R., Boudes P., Lockhart D. J., Valenzano K. J., Benjamin E. R. A pharmacogenetic approach to identify mutant forms of  $\alpha$ -galactosidase a that respond to a pharmacological chaperone for Fabry disease // Human Mutation. 2011. № 8 (32). C. 965–977.
146. Zampetti et al Angiokeratoma decision-making and for the diagnosis of Fabry disease. // British J of Dermat. 2012. C. 712–720.

147. Zeidner K.M., Desnick R.J. I. Y. A. Quantitative determination of globotriaosylceramide by immunodetection of glycolipid-bound recombinant Verotoxin B subunit original research. // *Anal. Biochem.* 1999. (267). C. 104–113.