

**МАЗАНОВА НАТАЛЬЯ НИКОЛАЕВНА**

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

1.5.7. Генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

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

**Научный руководитель:**

Доктор медицинских наук,  
профессор, академик РАЕН

**Асанов Алий Юрьевич**

**Научный консультант:**

Доктор биологических наук

**Савостьянов Кирилл Викторович**

**Официальные оппоненты:**

Доктор медицинских наук, профессор,  
руководитель лаборатории популяционной генетики Научно-исследовательского института медицинской генетики ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

**Назаренко Мария Сергеевна**

Кандидат медицинских наук, доцент

кафедры общей и медицинской генетики МБФ ФГАОУ ВО "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Барышникова Наталья Владимировна**

**Ведущая организация:**

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

Защита диссертации состоится 28 февраля 2024 года в 17.00 на заседании диссертационного совета ПДС 0300.005 на базе ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

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

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

Автореферат диссертации разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 года

Ученый секретарь

диссертационного совета ПДС 0300.005  
кандидат биологических наук, доцент

**Гигани Ольга Олеговна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Болезнь Фабри (БФ), МММ 301500, является редким X-сцепленным наследственным заболеванием нарушения обмена гликофинголипидов, для которого характерно снижение вплоть до полного отсутствия 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 (Гб3) и родственных ему гликофинголипидов (лизо-Гб3) в лизосомах, приводя к нарушениям функционирования всех жизненно важных систем организма. Полагают, что лизосомальное накопление и клеточная дисфункция порождают каскад событий, приводящих к гибели клеток, нарушению энергетического метаболизма, оксидативному стрессу, поражению микрососудов, нарушению функции К/Са-каналов в эндотелиоцитах, ишемии тканей, обуславливая развитие фиброза тканей сердца и почек. Цереброваскулярные поражения, сердечно-сосудистые, а также терминальная почечная недостаточность являются главными причинами сокращения продолжительности жизни и летальных исходов<sup>1,2</sup>.

Потеря функции фермента обусловлена изменениями аминокислотной последовательности лизосомальной  $\alpha$ -гал А, которую определяет ген *GLA*, расположенный в хромосомной области Xq22 и включающий 7 экзонов общей протяженностью 1287 пар нуклеотидов. Таким образом, развитие заболевания обусловлено эффектами патологических мутаций в гене *GLA*, в результате чего не только изменяется активность  $\alpha$ -гал А, но и происходит накопление токсических метаболитов. Именно в связи с этим БФ относят к генетически обусловленным болезням накопления<sup>3</sup>. На сегодняшний день описано более 1000 различных мутаций гена *GLA*, 758 из которых считаются патогенными вариантами, представленных миссенс и нонсенс мутациями, мутациями сайта сплайсинга, делециями и инсерциями. В большинстве семей с БФ заболевание обусловлено уникальными редкими мутациями, отчасти объясняющими существование клинического полиморфизма БФ и значительную вариабельность остаточной активности энзима.

Для заболевания характерна гетерохрономия первых симптомов. У детей мужского пола, БФ манифестирует несколько раньше в сравнении с девочками (как правило, в возрасте 3–10 лет).

### Степень ее разработанности темы исследования

В настоящее время для лечения БФ разработана и используется ферментозаместительная терапия (ФЗТ) рекомбинантной человеческой  $\alpha$ -галактозидазой А. Успешность ФЗТ напрямую связана с максимально ранней постановкой диагноза. Однако, постановка диагноза и оказание адекватной помощи значительно запаздывают или проводятся только в виде симптоматической терапии. Более того, постановка диагноза на доклинической стадии и раннее начало проведения ФЗТ, позволяют предотвратить необратимые изменения органов и тканей и в большинстве случаев существенно облегчить состояние детей.

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

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

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

Вместе с тем широкий клинический полиморфизм, а также значительное число фенокопий в виде известных нозологических состояний существенно затрудняет долабораторную диагностику заболевания.

В настоящее время разрабатываемые программы и алгоритмы не всегда реализуемы в условиях стационара и требуют мобилизации всего потенциала ЛПУ для постановки диагноза и лечения пациента. Вышеуказанные моменты являются поводом для продолжения научных исследований с целью поиска новых направлений, с применением технологии тандемной масс-спектрометрии и массового параллельного секвенирования для постановки точного лабораторного диагноза<sup>4</sup>.

### **Цель и задачи исследования**

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

Для достижения цели диссертационного исследования были сформулированы следующие задачи:

1. Получить образцы крови пациентов из групп риска болезни Фабри и провести селективный скрининг биохимическими и молекулярно-генетическими методами, определив наиболее частые клинические проявления БФ у выявленных пациентов.
2. Оценить чувствительность и специфичность метода измерения концентрации субстрата лизо-Гб3 и активности фермента  $\alpha$ -гал А для диагностики и мониторинга терапии БФ.
3. Определить спектр и относительные частоты патогенных вариантов гена *GLA* в выборке российских пациентов с болезнью Фабри.
4. Оценить силу взаимосвязи генотипа и тяжести клинических вариантов болезни Фабри.
5. Предложить оптимальный алгоритм диагностики болезни Фабри у российских пациентов.

### **Научная новизна исследования**

Впервые осуществлен селективный скрининг 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 не своевременность диагностики БФ, связанная с проведением большого числа необоснованных диагностических и лечебных вмешательств.

Впервые в РФ проведено исследование атипичной формы БФ, включающее технологию массового параллельного секвенирования. Впервые показано, что накапливаемый в организме лизо-Гб3 может являться биомаркером для первичного скрининга российских пациентов с БФ в паре с молекулярно-генетическим методом исследования, включающим анализ кодирующих и

---

<sup>4</sup> Soden S.E., et al. Effectiveness of exome and genome sequencing guided by acuity of illness for diagnosis of neurodevelopmental disorders // Sci. Transl. Med. 2014. Vol. 6, no. 265. P. 265ra168.

прилегающих интронных областей гена *GLA* в качестве подтверждающей диагностики БФ. Всего в гене *GLA* идентифицировано 36 различных мутаций с преобладающей частотой в экзонах 5 (22%), 6 (19%) и 7 (25%). Большую часть выявленных патогенных вариантов составляют миссенс мутации 23 (63,9%), также обнаружено 5 (13,9%) делеций, 7 (19,4%) нонсенс-мутаций и 1 (2,8%) дупликация.

В исследовании не было выявлено мажорных мутаций. У 12 (33%) пациентов были выявлены новые мутации, не описанные ранее в базе данных HGMD (Human Genome Mutation Database), для большинства которых описаны вызываемые ими фенотипические проявления болезни.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Научно-практические данные, полученные в результате настоящего исследования с использованием технологии тандемной масс-спектрометрии для определения активности фермента  $\alpha$ -гал А и концентрации субстрата лизо-ГбЗ, позволяют установить закономерности определенных процессов, происходящих в организме человека, страдающего болезнью Фабри, а методы подтверждающей диагностики с применением технологии секвенирования позволяют выявить корреляции генотипа и фенотипа у пациентов с болезнью Фабри.

Проведенные исследования показали возможность использования лизо-ГбЗ в качестве первичного биомаркера. В ходе работы определены регионы России с наибольшим и наименьшим числом выявленных пациентов с БФ. Охарактеризован спектр и типы мутаций у российских пациентов с БФ. Выявлены новые патогенные варианты гена *GLA*, ранее не описанные в международной базе The Human Gene Mutation Database (HGMD). Впервые осуществлен комплексный подход к диагностике БФ и к оценке эффективности лечения с использованием различных скрининговых подходов в Российской Федерации. Выявленные новые 8 патогенных вариантов гена *GLA* с классической формой пополняют международную базу данных мутаций человеческого генома HGMD, почти на 0,8%.

Предложен усовершенствованный для медицинской практики РФ алгоритм диагностики БФ, который может быть использован для выявления групп риска по наличию заболевания и их своевременного специализированного обследования, определения степени выраженности клинических проявлений.

### **Внедрение результатов работы в практику**

Результаты работы и рекомендации внедрены в научно-исследовательскую и практическую деятельность. Используются при оказании медицинской помощи пациентам с подозрением на болезнь Фабри в лаборатории молекулярной генетики и медицинской геномики Центра фундаментальных исследований в педиатрии и применяются при работе в Консультативно-диагностическом центре ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Результаты внедрены в учебный процесс кафедры медицинской генетики ФГБОУ ДПО РМАНПО 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 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 ГЛЖ.
3. Относительные частоты и спектр патогенных вариантов гена *GLA*, вызвавших БФ у 36 российских пациентов, выявленных в результате проведения селективного скрининга, не позволяет определить мажорные мутации, характерные для определенных регионов РФ.
4. Генотип-фенотипические корреляции, выявленные у российских пациентов с БФ, могут быть использованы для прогнозирования течения болезни и мониторинга эффективности терапии.
5. Оптимизация алгоритмов диагностики классической и атипичной формы БФ позволит выявлять это редкое генетическое заболевание у российских пациентов с эффективностью, приближающейся к 100%.

### Степень достоверности и апробации результатов

Высокая степень достоверности результатов диссертационного исследования подтверждается значительным числом проведенных исследований на репрезентативной выборке

российских пациентов с подозрением на болезнь Фабри, выбором дизайна исследования, соответствующего поставленной цели и сформулированным задачам настоящей работы.

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

Исследование активности фермента  $\alpha$ -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 обчисленными экспериментальными данными, которые наглядно представлены в виде рисунков и таблиц.

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

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

### **Публикации по теме диссертации**

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

### **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.

### **Структура и объем диссертации**

Работа включает введение, обзор литературы, главу собственных исследований, заключение, выводы, список использованной литературы. Диссертация изложена на 130 страницах машинописного текста, проиллюстрирована 20 таблицами, 27 рисунками. Библиографический список литературы состоит из 142 публикаций, из них 131 зарубежных и 11 отечественных источников.

### **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.

### **Этическая экспертиза**

Исследование было одобрено на заседании Локального этического Комитета ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), протокол № 10-19 от 17.07.2019 г.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

Научные исследования проведены на базе кафедры медицинской генетики Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского (научный руководитель работы – профессор, д.м.н. Асанов А.Ю.) федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) (ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), ректор – академик РАН Глыбочко П.В.) и на базе лаборатории молекулярной генетики и медицинской геномики Центра фундаментальных исследований в педиатрии (начальник Центра – д.б.н. Савостьянов К.В.) федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, директор – д.м.н., профессор Фисенко А.П.). Представителями пациентов, а

также самими пациентами в возрасте старше 14 лет было подписано информированное согласие на обработку персональных данных.

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

### **Лабораторные методы исследования**

Биохимическое исследование активности фермента  $\alpha$ -гал А и концентрации биомаркера лизо-Гб3 измеряли на тандемном масс-спектрометре Bruker Maxis Impact (Bruker Daltonics, Германия). Для измерения активности фермента использовали субстраты и внутренние стандарты, производимые компанией CDC (Centers for Disease Control and Prevention, США). Измерение концентрации лизо-Гб3 проводили с использованием внутреннего стандарта лизоцерамидтригексозида (Matreya, США). Хроматографическое разделение проводили с помощью хроматографической колонки YMC-Triat C18, 50x2.0 (YMC, Япония) на хроматографе Agilent 1260 (Agilent, США).

Выделение геномной ДНК из крови осуществляли с помощью набора реактивов DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Германия) на автоматической станции QIAQUBE (QIAGEN, Германия), согласно протоколу производителя<sup>5</sup>. Качество и количество ДНК оценивалось при помощи спектрофотометра Nano Vue (GE Healthcare, Швеция), а также на флуориметре Qubit 3.0 (Invitrogen, США).

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

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

Секвенирование методом Сэнгера осуществляли при помощи набора реактивов BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, США) по протоколу и рекомендации производителя<sup>6</sup>. Высокопроизводительное секвенирование проводили с использованием набора реагентов Ion Pius Fragment Library Kit (Thermo Fisher Scientific, США) с последующим целевым обогащением гибридизации с биотинилированными пробами SeqCap EZ (Roche, США), согласно протоколу производителя<sup>7</sup>. Секвенирование обогащенных библиотек проводили на платформах MiSeq (Illumina, USA, San Diego) и NextSeq550DX (Illumina, USA, San Diego).

Анализ патогенности проводился для всех выявленных вариантов с частотой менее 1% по базе

<sup>5</sup> QIAGEN. QIAamp® DNA Mini Blood Mini Handbook. 5<sup>th</sup> ed. 2016. URL:

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

<sup>6</sup> Thermo Fisher Scientific. Applied Biosystems. BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protocol. URL: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms\\_081527.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_081527.pdf).

<sup>7</sup> Roche. SeqCap EZ Library SR. User's Guide. URL: <https://technical-support/roche/com/layouts/net/pid/Download.aspx?documentID=ee33953e-0bf0-e711-4ebf-00215a9b3428&fileName=RSS.00215a9b3428&filename=RSS>.

данных gnomAD<sup>8</sup> v.2.1.1 и отсутствующих в базе данных HGMD professional (version 2020.1. June 2020). Классификация нуклеотидных вариантов по патогенности проводилась на основе биоинформатических модулей SIFT, PolyPhen-1, PolyPhen-2 и Mutation Tester, интегрированных в программу Alamut Visual Plus (version 1.5.1 SOPHiA GENETICS, Switzerland, Lausanne), а также с помощью руководства по интерпретации данных последовательности нуклеотидов ДНК человека<sup>10</sup>. Сравнение последовательностей нуклеотидов с базой данных GenBank Accession<sup>9</sup> проводили при помощи программного обеспечения Geneious R10 (Biomatters, Новая Зеландия)

### Дизайн исследования

Дизайн исследования включал шесть основных этапов (Рисунок 1).

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

**Второй этап.** Осуществить сортировку биологического материала соответственно сведениям ретроспективного анализа сопровождаемой медицинской документации (выписки из истории болезни, амбулаторных карт). Материал для исследования был разделен на две группы. Первая группа составила 10300 образцов пятен крови пациентов из разных отделений государственных и частных медицинских учреждений, направляемых с целью поиска классической формы БФ. Во вторую группу вошли образцы пятен крови 1956 пациентов из кардиологических отделений с направляющим диагнозом гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) с подозрением атипичной форму БФ.

**Третий этап.** В соответствии с задачами исследования для образцов крови двух сформированных выборках 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 высокопроизводительного секвенирования для исключения различных мутаций, приводящих к БФ.

**Четвертый этап.** Проведение молекулярно-генетической диагностики кодирующих и прилегающих интронных областей гена *GLA* в группе пациентов с подозрением на классическую форму БФ, имеющих сниженную активность фермента  $\alpha$ -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

---

<sup>8</sup> Genome Aggregation Database (gnomAD). URL: <https://gnomad.broadinstitute.org>.

<sup>9</sup> Рыжкова О.П., и др. Руководства по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2) // Медицинская генетика.2019. Т. 18, №2. С. 3-23.

<sup>10</sup> GenBank Accession URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>.

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-Г63 в выборке российских пациентов с БФ с помощью статистических программ.

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

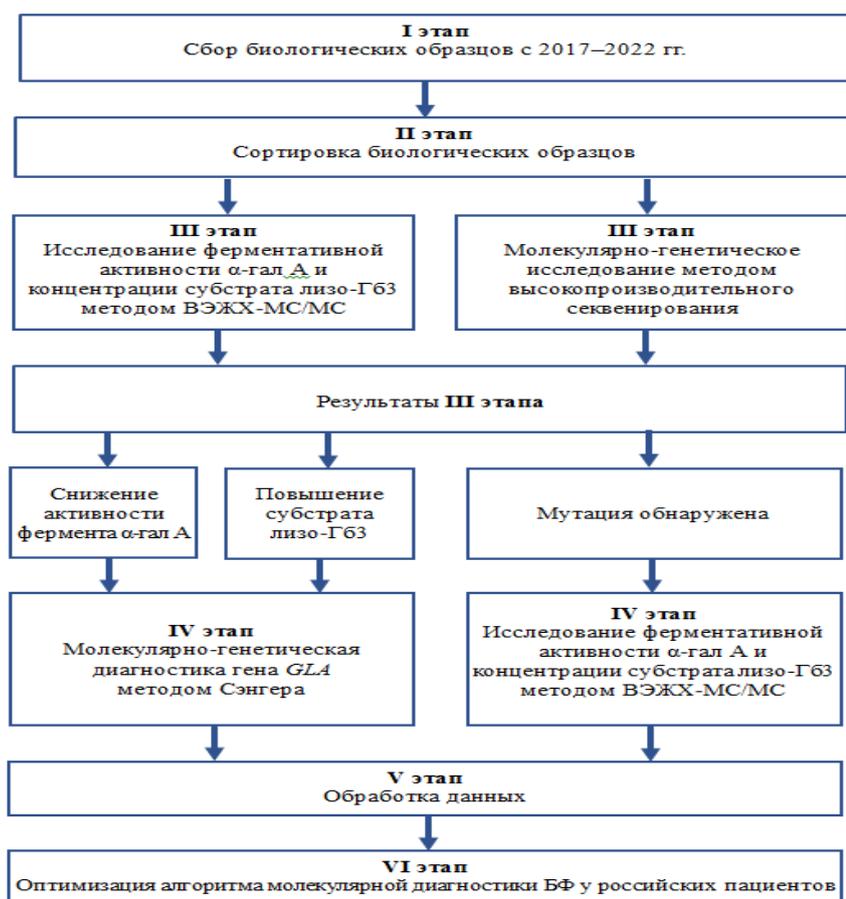


Рисунок 1 – Дизайн ретроспективно-проспективного нерандомизированного исследования.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате селективного скрининга, проведенного в период с 2017 по 2022 год в лаборатории молекулярной генетики и медицинской геномики Центра фундаментальных исследований в педиатрии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, было проанализировано 12256 сухих пятен крови, поступивших из разных регионов Российской Федерации, и разделенных на две группы. Группа пациентов с подозрением на классическую форму БФ составила 10300. Соотношение мужского пола к женскому полу в этой группе составило 8:1 соответственно (9167 пациентов мужского пола и 1133 пациентов женского пола). Средний возраст на момент исследования у мужчин составил 35,7 года, а у женщин 42,5 года. Частота выявленных в этой группе случаев БФ составила 28 (0,27%) пациентов. Неравномерность распределения пациентов по полу связана с тем, что у гетерозиготных женщин сложнее

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

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

Для определения референсных значений активность фермента  $\alpha$ -гал А была измерена у 100 здоровых пациентов, которые вошли в контрольную группу и обследованы в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России. Значения ферментативной активности  $\alpha$ -гал А в сухих пятнах крови с медианой, средним, интерквартильным размахом, максимальными и минимальными значениями в группе пациентов с патологическими вариантами гена *GLA*, а также в контрольной группе представлены в табличном (таблица 1) и графическом (рисунок 2) виде. Оптимальная отрезная точка для определения ферментативной активности  $\alpha$ -гал А составила 1,87 мкмоль/литр/ч, что соответствует зарубежным данным.

Таблица 1 – 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

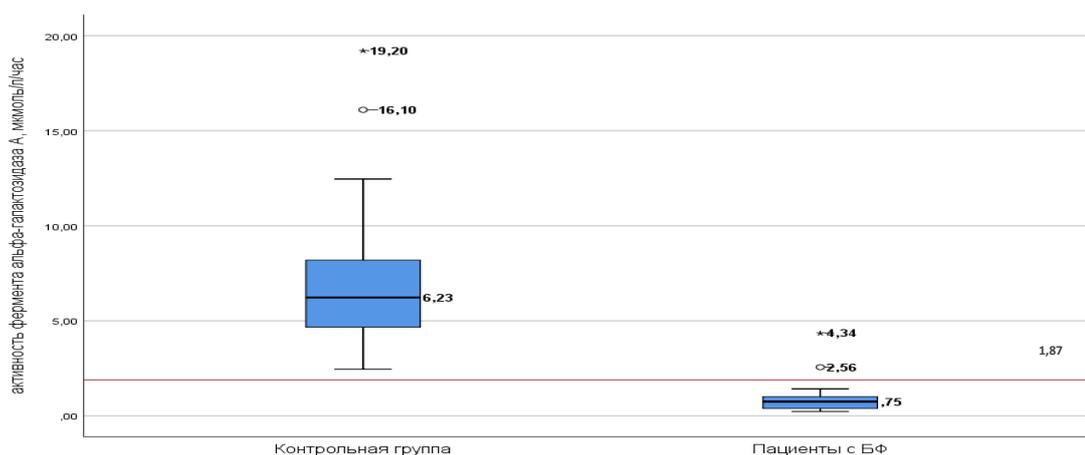


Рисунок 2 – Сравнение значений ферментативной активности  $\alpha$ -гал А в группе пациентов с БФ и контрольной группе.

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

Значения концентрации субстрата лизо-ГБЗ в сухих пятнах крови с медианой и интерквартильным размахом, максимальными и минимальными значениями в группе пациентов с

БФ, а также в контрольной группе представлены в табличном (таблица 2) и графическом виде (рисунок 3).

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

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

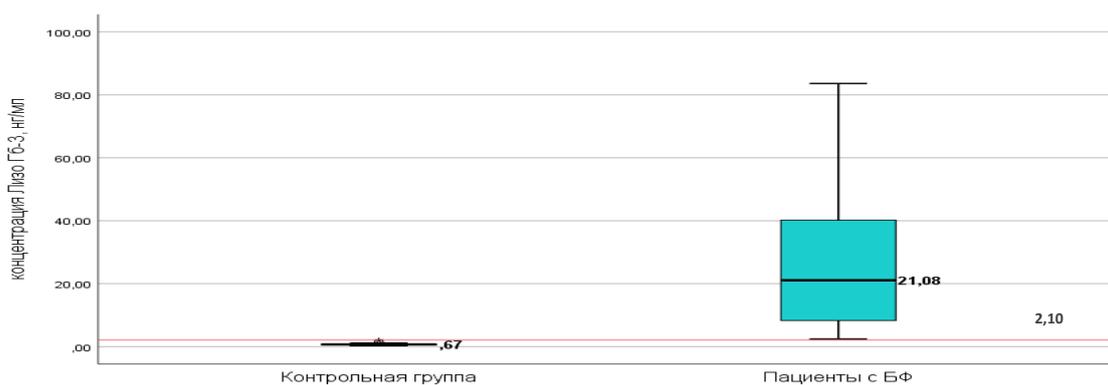


Рисунок 3 – Сравнение значений концентрации субстрата лизо-Гб3 в группе пациентов с БФ и контрольной группе.

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

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

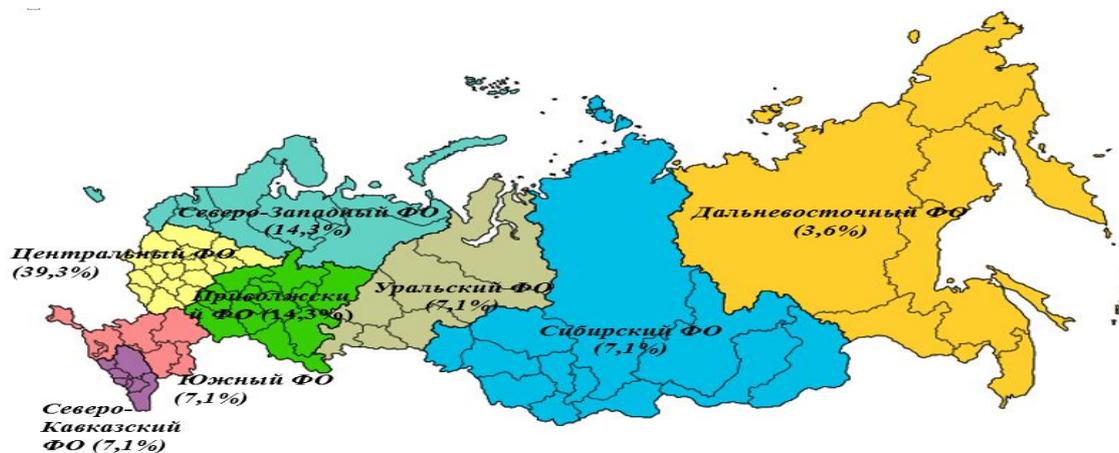


Рисунок 4 – Распределение пробандов с болезнью Фабри по федеральным округам России

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### Характеристика клинических проявлений пациентов с классической формой болезни Фабри

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

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

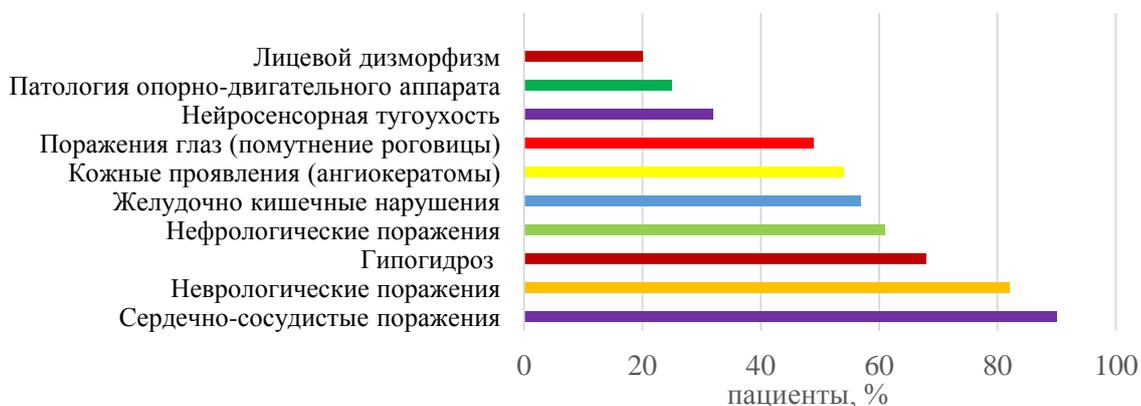


Рисунок 5 – Клинические проявления БФ у выявленных нами пациентов.

### Семейные случаи с классической формой БФ

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

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

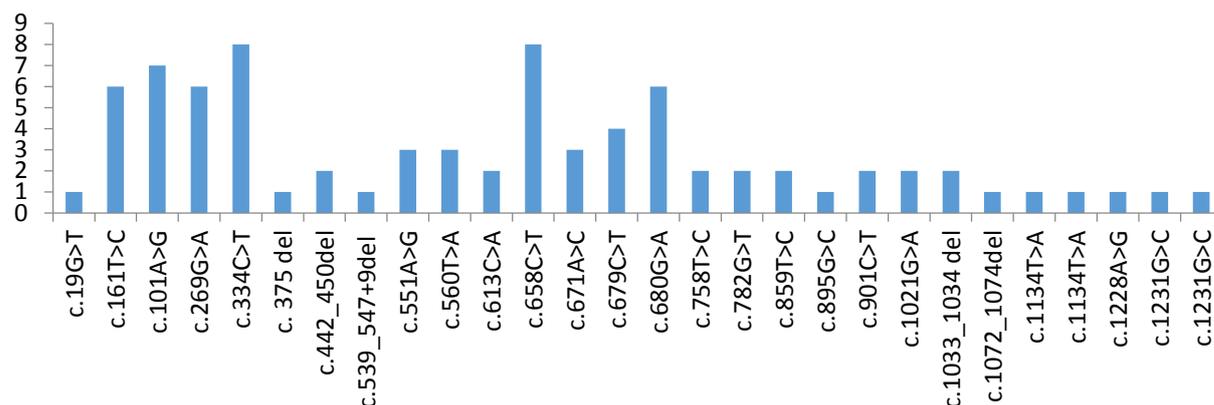


Рисунок 6 – Структура семейных случаев БФ

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

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

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

№ п/п	Пол	Возраст, лет	Нуклеотидный вариант, аминокислотный вариант	Частота, в gnomAD, %	Анализ патогенности	$\alpha$ -гал А, мкмоль/л/ч	лизо-Гб3, нг/мл
1	м	51	<i>c.640-794_640-791del</i>	н/д	неизвестная клин. значимость	4,57	1,20
2	ж	68	<i>c.1288_1289dup, p.(X430FextX?)</i>	н/д	вероятно патогенный	0,88	4,60
3	м	45	<i>c.546T&gt;C, p.(Asp182Asp)</i>	н/д	неизвестная клин. значимость	3,86	0,24
4	ж	69	<i>c.427G&gt;A, p.(Ala143Thr)</i>	0,051	неизвестная клин. значимость	5,46	0,47
5	м	42	<i>c.902G&gt;A, p.(Arg301Gln)</i>	н/д	патогенный	0,22	7,40
6	ж	68	<i>c.416A&gt;G, p.(Asn139Ser)</i>	0,019	вероятно доброкачественный	2,36	2,05
7	ж	69	<i>c.971T&gt;G, p.(Leu324Trp)</i>	н/д	неизвестная клин. значимость	4,25	0,79
8	ж	49	<i>c.897C&gt;A, p.(Asp299Gln)</i>	н/д	вероятно патогенный	1,82	3,06
9	ж	10	<i>c.899T&gt;C, p.(Leu300Cys)</i>	н/д	патогенный	4,02	2,95
10	м	53	<i>c.902G&gt;A, p.(Arg301Gln)</i>	н/д	патогенный	0,42	6,94
11	ж	66	<i>c.782del, p.(Gly261Valfs*8)</i>	н/д	патогенный	3,77	3,73
12	м	67	<i>c.644A&gt;G, p.(Asn215Ser)</i>	0,0005	патогенный	0,66	5,46

В нашем случае среди 12 пациентов с патогенными, вероятно патогенными вариантами, а также с вариантами с неизвестной клинической значимостью, обнаруженными в результате селективного скрининга, анализ биохимических маркеров позволил выявить трех мужчин и четырех женщин с аномальным значением лизо-Гб3, три женщины из числа которых были с нормальной активностью  $\alpha$ -гал А. И пять пациентов со сниженной активностью фермента  $\alpha$ -гал А, трех мужчин и двух женщин, имевших повышенные значения лизо-Гб3 (рисунок 7).

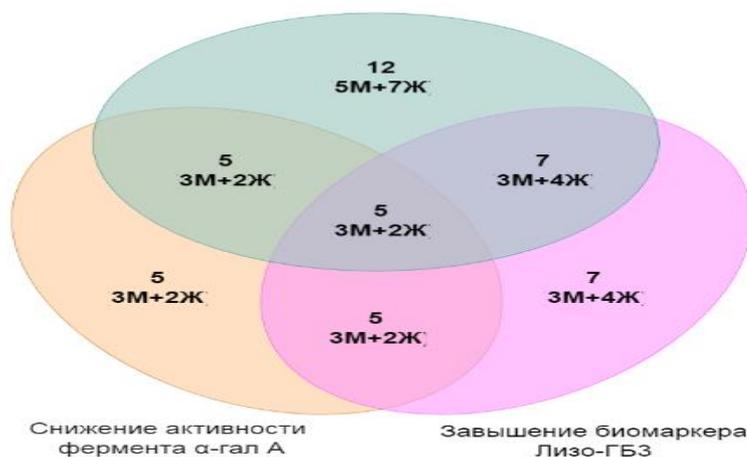


Рисунок 7 – Российские пациенты с атипичной формой БФ, проявляющиеся ГКМП, с изменениями активности фермента  $\alpha$ -гал А и концентрации лизо-Гб3.

### Молекулярно-генетическое исследование

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

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

Новые патогенные варианты были обнаружены в единственном числе у пациентов с БФ: *c.269G>A*, *p.(Cys90Tyr)*; *c.375del*, *p.(His125Glnfs\*5)*; *c.442\_450del*, *p.(Ser148\_Gly150del)*; *c.539\_547+9del*, *p.(Leu180\_Gly183delinsC)*; *c.551A>G*, *p.(Tyr184Cys)*; *c.560T>A*, *p.(Met187Lys)*; *c.782del*, *p.(Gly261Valfs\*8)*; *c.895G>C*, *p.(Asp299His)*; *c.897C>A*, *p.(Asp299Gln)*; *c.1134T>A*, *p.(Cys378\*)*; *c.1231G>C*, *p.(Gly411Arg)*; *c.1288\_1289dup*, *p.(X430FextX?)*. Что характерно для подобных исследований, проведенных за рубежом, и указывает на высокую популяционную вариабельность в когорте российских пациентов. 12 (33%) новых патогенных вариантов гена *GLA* дополняют базу HGMD, что составляя почти 1,5% всех описанных в ней мутаций гена *GLA*, вызывающих БФ.

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

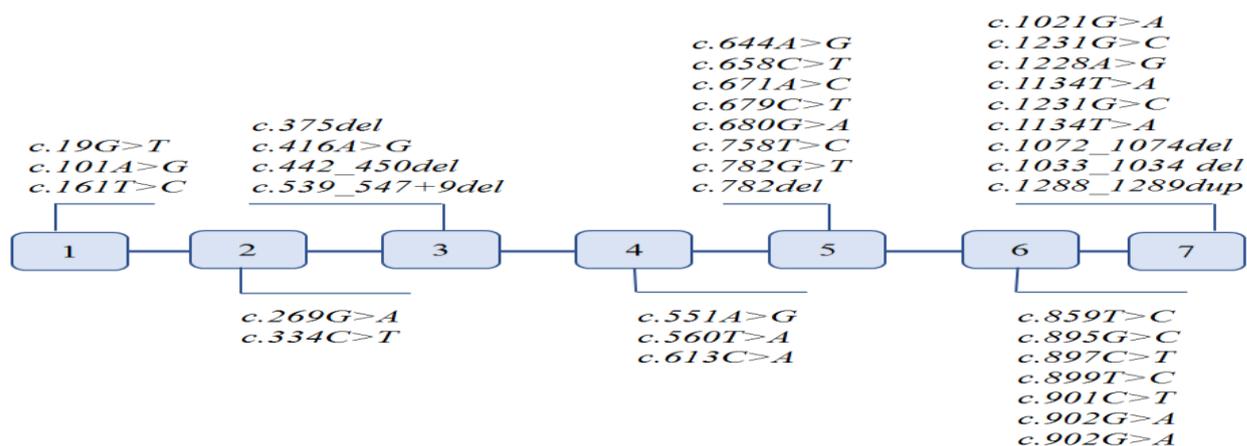


Рисунок 8 – Молекулярное разнообразие выявленных мутаций в различных экзонах гена *GLA* (1–7 – номера экзона гена *GLA*)

### Анализ фенотип-генотипических взаимосвязей при болезни Фабри

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

С использованием статистических тестов рассчитывались взаимосвязи между патогенными вариантами гена *GLA*, выявленными при классической форме заболевания и значениями концентрации биомаркера лизо-Гб3 с полом пробандов, наличием у пациентов инсультов, тХПН, а также тХПН в сочетании с инсультом.

Результаты проведенных исследований позволили выявить некоторые закономерности.

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

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

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

Концентрации лизо-Гб3 представлены значениями медианы и 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.

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

Учитывая эти данные, для оценки взаимосвязи частоты инсультов (ишемических и геморрагических) с типами патогенных вариантов гена *GLA* были сформированы две выборки

больных. В первую выборку включены 9 пациентов с «количественными» генетическими вариантами гена *GLA*, которые были представлены мутациями «сдвига рамки считывания» и нонсенс вариантами, преждевременно прерывающими синтез кодируемых белков. Вторая выборка была представлена 12-тью пациентами с «качественными» вариантами гена *GLA*, которые были представлены любыми другими миссенс-мутациями, таблица 6.

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

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

При исследовании взаимосвязи между типом патогенных вариантов гена *GLA* и инсультами нами выявлена тенденция к увеличению числа пациентов с инсультами в группе больных с «количественными» мутациями. Вместе с тем результаты обсчета с использованием точного критерия Фишера не достигли статистической значимости (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 7 и 8).

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

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

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

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

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

#### **Критерий контроля эффективности ферментозаместительной терапии у пациентов с классической формой БФ**

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

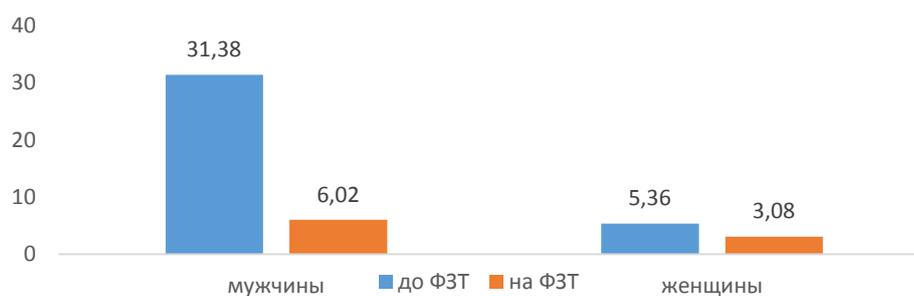


Рисунок 9 – Различия в концентрациях лизо-Гб3 у мужчин и женщин до ФЗТ и на ФЗТ.

### **Оптимизация алгоритма комплексной клинико-лабораторной диагностики болезни Фабри.**

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

В ходе настоящей работы разработан и оптимизирован алгоритм диагностики классической и атипичной формы БФ на основе измерения концентрации биомаркера лизо-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 10).



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

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



Рисунок 11 – Разработанный алгоритм диагностики БФ в качестве первичного теста определения биомаркера лизо-Г63 у пациентов с атипичной формой БФ.

Внедрение разработанных алгоритмов диагностики позволяет в значительной степени повысить точность диагностики БФ, оптимизировать мониторинг и лечение патологии на ранних этапах, повысить эффективность оказания медицинской помощи пациентам с БФ в РФ. Предложенные алгоритмы позволяют снизить временные, физические и психологические риски, а

также уменьшить расходы и стать экономически выгодным для здравоохранения страны при селективном скрининге БФ в российской популяции.

### **ВЫВОДЫ**

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

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

3. Продемонстрирована высокая чувствительность и специфичность метода измерения концентрации глоботриаозилсфингозина (лизо-Гб3), составившие соответственно 98,4% и 99,6% и доказана высокая эффективность биомаркера лизо-Гб3 для мониторинга терапии болезни Фабри.

4. По данным молекулярно-генетического анализа у 36 пробандов идентифицировано 33 различных патогенных варианта гена *GLA*, 66% 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, приводящей к образованию стоп-кодона; четыре варианта - небольшими делециями и один вариант - дупликацией, приводящей к потере стоп-кодона.

5. В результате анализа генотип-фенотипических взаимосвязей выявлены достоверные различия между концентрацией биомаркера лизо-Гб3 у больных БФ в зависимости от половой принадлежности. Различий между уровнем биомаркера лизо-Гб3, типом патогенных вариантов гена *GLA* и наличием у пациентов тХПН, а также тХПН в сочетании с инсультом не выявлено.

6. Впервые разработан алгоритм комплексной лабораторной диагностики атипичной формы болезни Фабри и усовершенствован алгоритм диагностики классической формы болезни Фабри, оправданный для применения в российской популяции.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

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

2. 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 патогенные варианты гена *GLA*.

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

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

5. Рекомендуется проводить молекулярно-генетическую диагностику БФ, начиная с исследования экзонов 5, 6 и 7 гена *GLA* у российских пациентов, т.к. 66% случаев приходится на мутации в этих экзонах.

### СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

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

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

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

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

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

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

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БФ – болезнь Фабри

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

Лизо-Гб3 – глоботриаозилсфингозин

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

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

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

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