

На правах рукописи

**Савостьянов Кирилл Викторович**

**ОПТИМИЗАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ  
РЕДКИХ НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ  
У РОССИЙСКИХ ПАЦИЕНТОВ**

03.02.07 – Генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Москва 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный консультант:**

доктор биологических наук,  
профессор, академик РАН

**Гинтер Евгений Константинович**

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук, профессор

**Назаренко Людмила Павловна**

НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра, заместитель директора по научной и лечебной работе, лаборатория наследственной патологии, руководитель

доктор биологических наук, профессор

**Сломинский Петр Андреевич**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», заместитель директора по научной работе, лаборатория молекулярной генетики наследственных болезней, заведующий

доктор биологических наук, доцент

**Хусаинова Рита Игоревна**

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Республиканский медико-генетический центр, заместитель директора по лабораторно-диагностической работе, Башкирский государственный медицинский университет, кафедра медицинской генетики и фундаментальной медицины, профессор

**Ведущая организация:**

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 года в 14 часов на заседании диссертационного совета Д.208.072.16 на базе ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России и на сайте <http://rsmu.ru>.

Автореферат диссертации разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ года.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, доцент

Ларина Вера Николаевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Наследственные болезни – генетически обусловленные заболевания, возникающие и развивающиеся вследствие нарушений в процессах хранения, передачи и реализации генетической информации. Существует описание более 10000 различных генетически обусловленных болезней<sup>1</sup>, которые принято разделять на хромосомные, генные и митохондриальные в зависимости от локализации генетического дефекта. Другая классификация наследственных болезней позволяет разделять доминантное, рецессивное и сцепленное с полом наследование тех или иных признаков. Кроме того, генетические дефекты могут возникать спорадически, например, в процессе гаметогенеза. К настоящему времени более 6000 наследственных заболеваний описаны как моногенные, их суммарная частота встречаемости оценивается как один случай на 100–200 живых новорожденных<sup>2</sup>. При этом ежегодно описывается 250–280 новых заболеваний<sup>3</sup>. Результаты ряда эпидемиологических исследований позволяют предположить, что основная часть разнообразия наследственной патологии приходится на редкие формы наследственных болезней, а основная часть больных – на частые формы<sup>4</sup>. В большинстве стран редкими болезнями считаются болезни, частота встречаемости которых не превышает 5 случаев на 10000 живых новорожденных<sup>5</sup>. При этом от редких болезней страдают миллионы людей во всем мире<sup>6</sup>, составляя примерно 6–8% населения земного шара<sup>7</sup>. 30% детей с такими болезнями не доживают до 5 лет, при этом 35% летальных исходов приходится на первый год жизни ребенка<sup>8</sup>. В Канаде было подсчитано, что в совокупности на моногенные болезни может приходиться до 40% работы стационарных педиатрических центров<sup>9</sup>, подчеркивая значимость существующей проблемы для современного здравоохранения. Поэтому усилия, направленные на устранение таких болезней, должны быть в первую очередь сосредоточены на их раннем выявлении.

Актуальность ранней диагностики особенно очевидна для наследственных болезней, имеющих патогенетическое лечение, своевременное получение

<sup>1</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.

<sup>2</sup> Гинтер Е.К., Зинченко Р.А. Наследственные болезни в российских популяциях // Вестник ВОГиС. 2006. Том 10, № 1. С. 106–125; OMIM Gene Map Statistics (Updated Jan 14, 2020). URL: <https://www.omim.org/statistics/geneMap>; Stöppler M.C. Genetic diseases (Disorder Definition, Types, and Examples). URL: [https://www.medicinenet.com/genetic\\_disease/article.htm](https://www.medicinenet.com/genetic_disease/article.htm).

<sup>3</sup> Chong J.X., et al. The genetic basis of mendelian phenotypes: discoveries, challenges, and opportunities // Am. J. Hum. Genet. 2015. Vol. 97, no. 2. Pp. 199–215.

<sup>4</sup> Гинтер Е.К., Зинченко Р.А. Наследственные болезни... С. 106–125.

<sup>5</sup> Stolk P., Willemens M.J., Leufkens H.G. Rare essentials: drugs for rare diseases as essential medicines // Bull. WHO. 2006. Vol. 84, no. 9. Pp. 745–751.

<sup>6</sup> Baird P.A., et al. Genetic disorders in children and young adults: a population study // Am. J. Hum. Genet. 1988. Vol. 42, no. 5. Pp. 677–693.

<sup>7</sup> Boycott K.M., et al. International cooperation to enable the diagnosis of all rare genetic diseases // Am. J. Hum. Genet. 2017. Vol. 100, no. 5. Pp. 695–705.

<sup>8</sup> Global Genes. URL: <https://globalgenes.org/rare-diseases-facts-statistics/>.

<sup>9</sup> Scriver C.R., et al. The metabolic and molecular bases of inherited diseases. 3 vol. set. 7th ed. New York: McGraw Hill, 1995. 4605 p.

которого позволяет приостановить необратимые, а в большинстве случаев фатальные изменения органов и тканей пациентов, имеющих в своем геноме патогенные генетические дефекты. Большинство редких заболеваний, для которых разработана такая терапия, составляют многочисленную по количеству и обширную по генетическим и фенотипическим проявлениям группу моногенных наследственных болезней, затрагивающих расстройства метаболизма.

Наиболее достоверным алгоритмом молекулярной диагностики наследственных болезней обмена считается двухэтапная диагностика, на первом этапе которой с помощью биохимической диагностики отделяются единичные биологические образцы с параметрами, отличными от нормальных референсных значений, после чего они подвергаются подтверждающей генетической диагностике для выявления первопричины развития болезни.

Массовое обследование новорожденных на наследственные болезни, поддающиеся лечению, – главное достижение медицинской генетики, как науки. Актуальность совершенствования методов такого обследования не вызывает сомнения ни в одной из развитых стран мира, так как позволяет экономить огромные материальные ресурсы, используя последние достижения современной науки. С помощью этих же методов возможно проводить выборочный скрининг, направленный на выявление наследственных болезней в группах риска, отобранных по соответствующему фенотипу, в близкородственных браках, либо в семьях, отягощенных наследственными болезнями, используя в числе прочих пренатальную и преимплантационную диагностику для предупреждения повторных случаев возникновения заболеваний. Важность такого рода профилактических мер очевидна и бесспорна, так как они способны существенно уменьшить раннюю детскую смертность и раннюю инвалидизацию многих больных детей, а в перспективе призваны оздоровить популяцию, за счет сокращения новых случаев.

Актуальность разработки новых протоколов генетической диагностики и оптимизация существующих очевидна и для наследственных болезней, обладающих сходным фенотипом, причиной возникновения которых служат мутации в нескольких, зачастую протяженных генах, когда постановка правильного диагноза способна скорректировать лечение, либо изменить его кардинальным образом. В настоящее время для этих целей успешно применяется технология массового параллельного секвенирования<sup>10</sup>.

Настороженность педиатров и профессионализм врачей-генетиков позволяет очертить спектр предполагаемых патологических состояний, назначая диагностику одного заболевания, либо группы болезней в зависимости от фенотипа конкретного ребенка. Алгоритмы диагностики наследственных болезней необходимо создавать, обладая информацией о спектре и частотах мутаций, характерных для определенных популяционных групп, а новые, не описанные в мире ранее генетические варианты, должны проходить обязательную процедуру подтверждения их патогенности на биоинформатическом уровне.

---

<sup>10</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.

### **Цель исследования**

Целью настоящей научной работы является разработка алгоритмов молекулярной диагностики наиболее частых генетических болезней, выявляемых в ведущем педиатрическом многопрофильном медицинском центре России в течение шести последних лет, и их оптимизация с учетом спектра и относительных частот обнаруженных патогенных вариантов генома, а также с учетом трудоемкости и эффективности используемых методов по принципу от простого к сложному.

### **Задачи исследования**

1. Провести селективный скрининг пациентов на болезни Фабри, Помпе, Гоше, мукополисахаридоз, тип I, тирозинемия, тип I и цистиноз, разработав методики измерения активности ферментов ( $\alpha$ -галактозидазы A,  $\alpha$ -1,4-глюкозидазы,  $\beta$ -D-глюкоцереброзидазы и  $\alpha$ -L-идуронидазы), измерения концентрации сукцинилациетона методом МС/МС и гликофинголипидов лизо-Гл1 и лизо-Гб3 методом ВЭЖХ-МС/МС в сухих пятнах крови, а также измерения концентрации цистина в лейкоцитах крови методом ВЭЖХ-МС/МС на тандемном масс-спектрометре Брукер, предложив их оптимизацию.

2. Определить относительные частоты и охарактеризовать спектр патогенных вариантов генома, ответственных за возникновение и развитие болезней Фабри, Гоше, Помпе, мукополисахаридозов, тип I и II, тирозинемии, тип I и цистиноза у российских пациентов, выявленных посредством проведенного нами селективного скрининга, а также у пациентов, диагноз которым был поставлен ранее, разработав методы их подтверждающей генетической диагностики и предложив их оптимизацию.

3. Разработать алгоритмы молекулярной диагностики несовершенного остеогенеза, тип I–XX, гликогеновой болезни, тип 0–XV, нефротического синдрома и кардиомиопатий методом секвенирования нового поколения и охарактеризовать относительные частоты и спектр мутаций, выявленных в ходе внедрения этих алгоритмов посредством обследования российских детей с подозрением на эти болезни.

4. Охарактеризовать клинические, возрастные, географические и генетические особенности российских пациентов с болезнями Фабри, Гоше, мукополисахаридозами, тип I и II, тирозинемией, тип I, цистинозом, несовершенным остеогенезом, гликогеновой болезнью, нефротическим синдромом и кардиомиопатиями.

5. Описать генотип-фенотипические корреляции российских пациентов с болезнями Фабри, Гоше, мукополисахаридозами, тип I и II, тирозинемией, тип I, цистинозом, несовершенным остеогенезом, гликогеновой болезнью, нефротическим синдромом и кардиомиопатиями.

### **Научная новизна**

Впервые проведен комплексный селективный скрининг болезней Фабри (БФ), Гоше (БГ), Помпе (БП), мукополисахаридозов, тип I (МПС, тип I) и тип II (МПС, тип II), тирозинемии, тип I в сухих пятнах крови, а также цистиноза – в лейкоцитах крови, изъятых у 30893 пациентов, отобранных в соответствии с

определенными клиническими признаками, на тандемном масс-спектрометре Брукер. Впервые показано, что накапливаемые в организме глоботриаозилсфингозин (лизо-Гб3) и гликозилсфингозин (лизо-Гл1) могут являться биомаркерами для первичного скрининга российских пациентов с БФ и БГ. Продемонстрировано, что концентрации цистина, сукцинилацетона, лизо-Гб3 и лизо-Гл1, достоверно различаясь у пациентов с цистинозом, тирозинемией, тип I, БФ и БГ соответственно, до начала патогенетической терапии и во время ее проведения, могут служить для мониторинга этой терапии. Осуществлен скрининг 554 детей с подозрением на моногенные формы нефротического синдрома (НС), гликогеновой болезни (ГБ), несовершенного остеогенеза (НО) и кардиомиопатий (КМП). Впервые установлены доли различных типов ГБ, моногенных форм НС, НО и КМП у российских детей, а также определен спектр мутаций, их вызывающий. Впервые в мире описан 321 новый нуклеотидный вариант генома человека, в том числе, 212 – патогенные, 73 – вероятно патогенные, 36 – с неизвестной патогенностью, не аннотированные в базе данных HGMD до проведения настоящего исследования, для большинства которых описаны вызываемые ими фенотипические проявления болезней. Впервые в мире показано наличие характерных для российских детей мутаций генов *CTNS*, *AGL*, *PYGL*, *RHKA2*, *RHKG2*, *RAF1*, *IFITM5*, *NPHS2*, *WT1*, *NPHS1* и *SMARCA1*, а также определены их относительные частоты.

### **Теоретическая и практическая значимость исследования**

Разработаны и оптимизированы алгоритмы молекулярной диагностики БФ, БГ, МПС, тип I и II, тирозинемии, тип I, цистиноза, НО, тип I–XX, ГБ, тип 0–XV, НС, КМП с учетом трудоемкости и эффективности использованных методов, а также спектра и относительных частот обнаруженных нами мутаций. Проведенные исследования показали, что измерение концентрации лизо-Гб3 можно использовать для прогнозирования развития классической или атипичной формы БФ у мужчин с не описанными ранее вариантами генома, а также с мутациями, описанными как для классической, так и для атипичной формы БФ. Мужчины, геном которых содержит нонсенс и фреймшифт мутации гена *GLA*, обладают повышенным риском развития инсульта по сравнению с мужчинами, обладающими любыми другими мутациями гена *GLA*: ОШ=7,9 (ДИ 1,5–55,4). Высокие значения лизо-Гб3 (медиана 95,5 нг/мл), выявленные до начала ферментозаместительной терапии (ФЗТ), могут служить неблагоприятным прогностическим фактором наступления инсультов у пациентов с БФ, отягощенной тХПН ( $p=0,004$ ). Достоверные различия в медианных значениях концентрации лизо-Гб3 и лизо-Гл1 до проведения ФЗТ и во время ее проведения ( $p<0,001$ ), позволяют использовать эти биомаркеры в качестве мониторинга проводимой терапии у российских пациентов с БФ и БГ соответственно. Описаны мутации, обнаружение которых позволяет прогнозировать развитие тяжелого и мягкого фенотипа среди российских пациентов с МПС, тип I. Обнаружение мутаций гена *IDS*, сдвигающих рамку считывания, у пациентов с синдромом Хантера, может служить неблагоприятным фактором развития аномалий клапанов сердца и/или кардиомиопатии ОШ=9,3 (ДИ 1,1–434,5), тогда как обладатели

миссенс мутаций гена *IDS* имеют пониженный риск развития этого фенотипического признака ОШ=0,12 (ДИ 0,01–0,67). Достоверные различия в медианных значениях концентрации сукцинилацетона и цистина у пациентов с тирозинемией, тип I и цистинозом соответственно, до проведения субстрат-редуцирующей терапии (СРТ) и во время ее проведения ( $p<0,001$ ) позволяют использовать эти биомаркеры в качестве мониторинга проводимой терапии. Гомозиготные нонсенс мутации гена *CTNS*: *c.283G>T*, *c.433C>T*, *c.450G>A*, *c.785G>A*, а также делеция, длиной 57 т.п.н, коррелируют с высокими концентрациями цистина, тогда как миссенс мутации *c.518A>G*, *c.627C>A*, *c.1015G>A*, коррелируют с незначительным превышением референсных концентраций цистина в полиморфноядерных лейкоцитах крови пациентов с цистинозом до проведения патогенетической терапии ( $p=0,003$ ). Дети с НО, обладающие миссенс мутациями центральных доменов генов *COL1A1* и *COL1A2*, приводящими к заменам остатка глицина, на другой аминокислотный остаток, обладают повышенным риском манифестации болезни с рождения ОШ=6,1 (ДИ 1,7–24,0) наряду с повышенным риском тяжелого поражения костной системы ОШ=6,7 (ДИ 1,8–28,5), по сравнению с детьми, обладающими любыми другими мутациями этих же генов ( $p<0,05$ ). Наше исследование продемонстрировало, что НО, тип I достоверно чаще вызывается нонсенс и фреймшифт мутациями гена *COL1A1* ( $p=0,001$ ). При этом шансы развития НО, тип I у пациентов, обладающих такими мутациями более чем в семь раз превышают шансы развития НО, тип III и IV ОШ=7,2 (ДИ 2,3–22,8). Установлена достоверная ассоциация ранней манифестации ГБ, тип III у детей с мутациями гена *AGL*, преждевременно прерывающими синтез кодируемого белка, при этом дети, обладающие такими патогенными вариантами, имеют повышенный риск манифестации болезни в возрасте до 6 месяцев по сравнению с детьми, имеющими в своем геноме миссенс мутации гена *AGL* ОШ=7,0 (ДИ 1,1–82,5). Наличие нуклеотидных вариантов генома, явившихся причиной развития НС у обследованных российских детей, коррелирует с ранней манифестацией болезни ( $p<0,001$ ), гистологической картиной ФСГС ( $p<0,001$ ) и тХПН ( $p=0,003$ ), являясь неблагоприятным прогностическим фактором. При этом, дети с НС, обладающие мутациями, приводящими к преждевременной терминации трансляции, а также мутациями, нарушающими канонические сайты сплайсинга, обладают повышенным риском ранней манифестации болезни ОШ=3,1 (ДИ 1,2–8,4) по сравнению с пациентами, обладающими любыми другими мутациями изученных генов ( $p=0,012$ ). Высокая частота выявленных мутаций среди пациентов с врожденным (93,6%) и инфантильным (62,5%) НС, позволяет рекомендовать молекулярно-генетическое обследование всем российским детям с НС, резистентным к стероидной терапии и дебютировавшим в первый год жизни, для выбора оптимальной схемы лечения. В группе детей с КМП, вызванными мутациями, возникшими *de novo*, существует ассоциация ( $p<0,001$ ) с беременностями, протекавшими с ОРВИ на ранних стадиях развития эмбриона, что может свидетельствовать о повышенном риске развития КМП, вызванных спонтанными мутациями, у детей, родившихся в результате таких беременностей, по сравнению с детьми с КМП, родившимися в

результате беременностей протекавших физиологически, а также беременностей, протекавших с любыми другими осложнениями ОШ=10,6 (ДИ 3,6–34,1).

Результаты отдельных этапов работы защищены патентами на изобретения RUS 2621161 и RUS 2621162 и представлены клиническими рекомендациями, утвержденными Минздравом РФ.

### **Методология и методы исследования**

Для анализа клинических, возрастных, географических и молекулярно-генетических особенностей пациентов с ЛБН, тирозинемией, тип I, НО, ГБ, КМП и НС была использована выборка из 31954 пациентов, проходящих лечение в различных отделениях ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, а также пациентов, поступивших в наш Центр из региональных медико-генетических консультаций, родильных домов, больниц, многопрофильных медицинских и диализных центров.

Измерение активности лизосомных ферментов в сухих пятнах крови, а также измерение концентрации сукцинилацетона и спектра аминокислот проводили методом ТМС. Измерение концентрации лизо-Гб3 и лизо-Гл1 в сухих пятнах крови, а также цистина – в цельной крови проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС).

Молекулярно-генетическую диагностику БФ, БГ, БП, МПС, тип I и II, тирозинемии, тип I и цистиноза проводили методом секвенирования по Сэнгеру, поиск протяженных делеций и дупликаций осуществлялся с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР), хромосомного-микроматричного анализа (ХММА) и мультиплексной лигазозависимой амплификации проб (MLPA).

Молекулярно-генетическую диагностику НО, КМП, НС и ГБ проводили с использованием секвенирования нового поколения (СНП) с последующей валидацией выявленных вариантов методом секвенирования по Сэнгеру.

Для статистического анализа полученных результатов был использован пакет программ Statistica 10.0. Биоинформатический анализ данных проводился с использованием программы Geneious, версия R10 (Biomatters, Новая Зеландия), а также программных модулей Alamut Batch, Alamut Focus и Alamut Visual (Interactive Biosoftware, Франция).

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Биомаркеры лизо-Гб3, лизо-Гл1, цистин и сукцинилацетон могут быть использованы в качестве первичных аналитов для проведения селективного скрининга пациентов на БФ, БГ, цистиноз и тирозинемии, тип I, а также в качестве мониторинга патогенетической терапии этих редких болезней у российских пациентов.

2. Относительные частоты и спектр мутаций, ответственных за возникновение и развитие БФ, БГ, БП, МПС, цистиноза, тирозинемии, различных типов НО, ГБ, НС и КМП, изученные у 1142 российских пациентов, позволят оптимизировать молекулярную диагностику этих редких болезней как в отдельных регионах, так и в России в целом.



3. Мутации, преждевременно прерывающие синтез кодируемого белка, коррелируют с ранней манифестацией и тяжелым течением БФ, МПС, тип I и II, ГБ, тип III и НС, однако, эти же классы мутаций ассоциированы с наиболее мягкой формой НО, тип I, а миссенс мутации остатков глицина центрального домена гена *COL1A1*, напротив, ассоциированы с тяжелыми формами НО, тип III и IV.

4. Для эффективного определения патогенности вариантов генома, не аннотированных до проведения настоящего исследования в базе данных HGMD, необходимо использование российского Руководства по интерпретации данных последовательности ДНК человека.

5. Описанные генотип-фенотипические корреляции российских пациентов с болезнями Фабри, Гоше, мукополисахаридозами, цистинозом, различными типами НО, НС и КМП, способствуют прогнозированию течения этих болезней и коррекции существующей патогенетической терапии.

6. Разработанные и оптимизированные алгоритмы молекулярной диагностики БФ, БГ, МПС, тип I, тирозинемии, тип I, цистиноза, НО, тип I–XX, ГБ, тип 0–XV, различных типов НС и КМП, позволяют выявлять эти редкие болезни у российских пациентов с эффективностью, приближающейся к 100%.

#### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 03.02.07 – Генетика (биологические науки), охватывающей проблемы изменчивости и наследственности, закономерности процессов хранения, передачи и реализации генетической информации на молекулярном, клеточном, организменном и популяционном уровнях в области исследований «Генетика человека. Медицинская генетика. Наследственные болезни».

#### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность результатов диссертационного исследования подтверждается достаточным количеством экспериментальных данных, репрезентативностью выборок, а также высокотехнологичными методами исследования, соответствующими поставленным в работе целям и задачам. Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, подкреплены убедительными фактическими данными, наглядно представленными в приведенных рисунках и таблицах. Подготовка, анализ и интерпретация полученных результатов проведены с использованием современных методов обработки информации и статистического анализа.

Диссертация апробирована на заседании проблемной комиссии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России (протокол №19 от 25.12.2019).

Основные результаты диссертационной работы были доложены и обсуждены на российских и международных научно-практических конференциях, семинарах и круглых столах: VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2014» (Москва, 2014), 4-й международной конференции по детским хроническим заболеваниям, инвалидности и развитию человека, ICCD 2015 (Иерусалим, Израиль, 2015), 47-м, 48-м, 50-м и 51-м Европейских конгрессах детских

нефрологов (Порту, Португалия, 2014; Брюссель, Бельгия, 2015; Глазго, Шотландия, 2017; Анталия, Турция, 2018), ежегодных симпозиумах международного Общества изучения врожденных нарушений метаболизма, SSIEM (Инсбрук, Австрия, 2014; Лион, Франция, 2015; Афины, Греция, 2018), 7-м, 8-м и 9-м Европейских конгрессах педиатров, EUROPAEDIATRICS (Флоренция, Италия, 2015; Бухарест, Румыния, 2017; Дублин, Ирландия, 2019), XVII, XVIII, XIX, XX, XXI Конгрессах педиатров России с международным участием «Актуальные проблемы педиатрии» (Москва, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019), VII Съезде Российского общества медицинских генетиков (Санкт-Петербург, 2015), 12-м, 13-м, 14-м, 15-м и 16-м ежегодных симпозиумах по изучению лизосомных болезней, WORLD Symposium (Сан-Диего, США, 2016, 2017, 2018; Орландо, США, 2019, 2020), научно-практической конференции «Школа редкого заболевания: Вопросы и ответы о Болезни Фабри» (Сестрорецк, 2016), научно-практических конференциях «Наставничество: диагностика и лечение синдрома Хантера в реальной клинической практике» (Москва, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020), научно-практических конференциях «Наставничество: диагностика и лечение болезни Гоше в реальной клинической практике» (Москва, 2016, 2017, 2019), 13-м Международном конгрессе врожденных нарушений метаболизма, ICIEM (Рио-де-Жанейро, Бразилия, 2017), научно-практической конференции «Современные достижения в диагностике и лечении орфанных заболеваний у взрослых: болезнь Гоше, как модель» (Москва, 2017), X Всероссийском конгрессе «Детская кардиология 2018» (Москва, 2018), I и II научно-практических конференциях «Полисистемные орфанные заболевания у взрослых, как междисциплинарная проблема», ПОМП (Москва, 2018, 2019), экспертном совете «Организация медицинской помощи пациентам с лизосомными болезнями накопления» (Москва, 2018), экспертном совещании «Встреча с экспертом: актуальные проблемы болезни Фабри у детей и подростков» (Москва, 2018), Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Сперанские чтения-2019» (Москва, 2019), II Общероссийской конференции с международным участием «FLORES VITAE. Неонатология и педиатрия» (Москва, 2019), V Российском конгрессе лабораторной медицины (Москва, 2019), V Московском городском съезде педиатров «Трудный диагноз в педиатрии» (Москва, 2019), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Осенние Филатовские чтения – важные вопросы детского здоровья» (Пенза, 2019).

### **Личный вклад автора**

Автором проведен анализ литературных источников по теме диссертационной работы, сформулированы цели и задачи исследования. Автор принимал непосредственное участие в разработке алгоритмов и анализе измерения активности и концентрации биомаркеров, в отборе целевых областей генома для СНП, в биоинформатическом анализе выявленных генетических вариантов и их валидации методом секвенирования по Сэнгеру. Интерпретация полученных данных и статистическая обработка результатов биохимических и молекулярно-генетических исследований, подготовка публикаций по

выполненной работе, а также обобщение результатов при написании и оформлении рукописи выполнялись автором самостоятельно.

Вместе с тем в диссертации использованы данные, полученные в соавторстве с сотрудниками лаборатории наследственных болезней обмена ФГБНУ «МГНЦ имени академика Н.П. Бочкова» (заведующая лабораторией д.м.н., профессор Е.Ю. Захарова), заведующей отделением орфанных заболеваний ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России д.м.н., профессором Е.А. Лукиной, заведующим кафедрой внутренних, профессиональных болезней и ревматологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России д.м.н., профессором С.В. Моисеевым, д.м.н., профессором кафедры госпитальной педиатрии им. академика В.А. Таболина ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России С.И. Поляковой.

Кроме того, алгоритмы молекулярной диагностики редких наследственных болезней у российских пациентов практически применялись автором в совместных исследованиях с различными подразделениями ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России: с отделением психоневрологии и психосоматической патологии (заведующая отделением д.м.н., профессор Л.М. Кузенкова), с отделением нефрологии (заведующий отделением д.м.н., профессор А.Н. Цыгин), с отделением гастроэнтерологии с гепатологической группой (заведующий отделением д.м.н. А.Н. Сурков), с отделением кардиологии (заведующая отделением д.м.н., профессор Е.Н. Басаргина).

### **Внедрение полученных результатов в практику**

Результаты проведенной научной работы внедрены в практическую работу подразделений ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, ФГБУ «Центральная клиническая больница с поликлиникой» Управления делами Президента РФ, ГБУ «Республиканская детская клиническая больница им. Е.П. Глинки» и ГБУ «Родильный дом» Минздрава Чеченской Республики, а также в образовательную работу кафедры медицинской генетики лечебного факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. М.И. Сеченова Минздрава России.

### **Публикации**

По теме диссертации автором опубликовано 79 научных трудов в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в российских и международных реферативных базах данных и системах цитирования, в том числе 27 научных статей в журналах, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, 2 монографии и 2 патента на изобретения.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 593 страницах и состоит из введения, основной части (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение), заключения, выводов, практических рекомендаций, описания перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы. Диссертация иллюстрирована 115 рисунками и 77 таблицами. Библиографический указатель включает 1037 наименований.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы исследования

Биологическим материалом для проведения селективного скрининга на БФ, БГ, МПС, тип I и тирозинемии, тип I являлись пятна крови, высушенные на фильтровальной бумаге, буккальный эпителий исследовался у пациентов с подозрением на семейные случаи БФ, для исследования остальных случаев использовалась цельная кровь.

Активность и концентрацию биомаркеров измеряли на тандемном масс-спектрометре Bruker Maxis Impact (Bruker Daltonics, Германия). Для измерения активности ферментов  $\alpha$ -галактозидазы А,  $\alpha$ -1,4-глюкозидазы,  $\beta$ -D-глюкоцеребозидазы и  $\alpha$ -L-идуронидазы использовали субстраты и внутренние стандарты, предоставленные компанией CDC (Centers for Disease Control and Prevention, США). Для измерения концентрации сукцинилацетона, а также спектра аминокислот и ацилкарнитинов использовали набор реактивов NeoBase™ (Wallac Oy, Финляндия) согласно инструкции компании производителя<sup>11</sup>. Для измерения концентрации цистина лейкоциты получали градиентным методом с использованием раствора Фиколла (Amresco, США) с последующим отделением фракции полиморфонуклеарных лейкоцитов, которые получали двойным градиентным методом с использованием HISTORAQUE-1077 и HISTORAQUE-1119 (SIGMA, Германия). Стабилизацию клеток проводили раствором N-этилмалеимида (SIGMA, Германия). Хроматографическое разделение проводили на хроматографе Agilent 1260 (Agilent, США) с использованием колонки Primesep 200 (SIELC, США). Измерение концентрации лизо-Гб3 проводили с использованием лизо-церамидтригексозида (Matreya, США) в качестве внутреннего стандарта. Измерение концентрации лизо-Гл1 проводили с использованием диметилпсихозина (Avanti® Polar Lipids, США) в качестве внутреннего стандарта. Хроматографическое разделение в обоих случаях проводили на хроматографе Agilent 1260 (Agilent, США) с использованием колонки YMC-Triart C18, 50x2.0 (YMC, Япония).

Выделение геномной ДНК из крови осуществляли с помощью набора реактивов DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Германия) на автоматической станции QIAQUBE (QIAGEN, Германия), согласно протоколу, рекомендованному производителем<sup>12</sup>. Для выделения ДНК из клеток буккального эпителия использовали метод фенол-хлороформной экстракции, согласно рекомендациям Green с соавторами<sup>13</sup>. Элюцию ДНК осуществляли в 100–200 мкл Low TE буфера (QIAGEN, Германия). Качество и количество ДНК оценивали при помощи спектрофотометра NanoVue (GE Healthcare, Швеция), а также флуориметра Qubit 3.0 (Invitrogen, США).

---

<sup>11</sup> MSMS Products : NeoBase™ Non-derivatized MSMS kit. URL: [https://newbornscreening.perkinelmer.com/products/msms\\_products/neobase\\_non-derivatized\\_msms\\_kit](https://newbornscreening.perkinelmer.com/products/msms_products/neobase_non-derivatized_msms_kit).

<sup>12</sup> QIAGEN. QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook. 5th ed. 2016. URL: <https://www.qiagen.com./ch/resources/download.aspx?id=62a200d6-faf4-469b-b50f-2b59cf738962&lang=en>.

<sup>13</sup> Green M.R., Sambrook J. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 3 vol. set. 4th ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2012. Pp. 47–54.

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

ПЦР проводили на термоциклерах Bio-Rad T100 (Bio-Rad, США) и ProFlex (Thermo Fisher Scientific, США) в 10–20 мкл смеси Amplitaq 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) в соответствии с протоколами и рекомендациями производителя<sup>14</sup>. Капиллярный электрофорез проводили на автоматических секвенаторах ДНК ABI 3500XL и ABI 3500 (Thermo Fisher Scientific, США).

Создание библиотек ДНК для проведения СНП осуществляли с использованием набора реагентов Ion Plus Fragment Library Kit (Thermo Fisher Scientific, США) с последующим целевым обогащением с помощью гибридизации с биотинилированными пробами SeqCap EZ (Roche, США), согласно протоколу производителя<sup>15</sup>. Секвенирование обогащенных библиотек проводили на секвенаторе Ion S5 согласно рекомендациям производителя<sup>16</sup>.

Поиск протяженных делеций и дупликаций в целевых областях проводили методом MLPA с использованием наборов реактивов производства компании MRC-Holland (Нидерланды) и анализом данных в компьютерной программе Coffalyser<sup>17</sup>. Для валидации выявленных вариантов проводили количественную ПЦР в реальном времени на амплификаторе Bio-Rad CFX 96 (Bio-Rad, США) с использованием интеркалирующего красителя iQ™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, США). Для поиска делеций и дупликаций свыше 50 т.п.н. применяли ХММА. Анализ проводили с применением микрочипов CytoScan HD (Thermo Fisher Scientific, США) на оборудовании Геноскан 3000 (Геноскан, Россия) согласно протоколу, рекомендованному производителем<sup>18</sup>. Данные обрабатывали с помощью встроенного программного обеспечения Chromosome Analysis Suite (Thermo Fisher Scientific, США).

Анализ качества полученных геномных данных, а также картирование прочтений проводили при помощи встроенного программного обеспечения Torrent Suite Software и Torrent Server (Thermo Fisher Scientific, США). Поиск и аннотацию выявленных вариантов проводили при помощи программы Ion Reporter (Thermo Fisher Scientific, США). Дальнейший анализ осуществляли в

---

<sup>14</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>15</sup> Roche. SeqCap EZ Library SR. User's Guide. URL: [http://technical-support.roche.com/\\_layouts/net.pid/Download.aspx?documentID=ee33953e-0bf0-e711-4ebf-00215a9b3428&fileName=RSS](http://technical-support.roche.com/_layouts/net.pid/Download.aspx?documentID=ee33953e-0bf0-e711-4ebf-00215a9b3428&fileName=RSS).

<sup>16</sup> Thermo Fisher Scientific. Ion S5™ and Ion S5™ XL Instrument. User Guide. URL: [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0010811\\_Ion\\_S5\\_S5XL\\_Instrument\\_UG.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0010811_Ion_S5_S5XL_Instrument_UG.pdf).

<sup>17</sup> Там же.

<sup>18</sup> Thermo Fisher Scientific. CytoScan™ Assay. User Guide. Manual Workflow. URL: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/703038\\_cytoscan\\_assay\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/703038_cytoscan_assay_UG.pdf).

программах Alamut Batch и Alamut Focus (Interactive Biosoftware, Франция). Минорные варианты генома с частотой встречаемости менее 0,5% в соответствии с информационной базой gnomAD<sup>19</sup>, в том числе нуклеотидные варианты, не описанные ранее, подвергались биоинформатическому анализу в программе Alamut Visual (Interactive Biosoftware, Франция) и валидировались при помощи секвенирования по Сэнгеру. Последовательности нуклеотидов сравнивались с референсной базой данных GenBank Accession<sup>20</sup> с использованием программы Geneious, версия R10 (Biomatters, Новая Зеландия). Патогенность нуклеотидных вариантов, не описанных ранее, определялась с помощью российского Руководства по интерпретации данных<sup>21</sup>.

Для статистического анализа полученных результатов применялся пакет Statistica 10.0 (StatSoft, IBM Америка)<sup>22</sup>. Для количественных данных применялся критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони, медианный тест, критерий Краскела – Уоллиса, критерий Уилкоксона. Для бинарных признаков применялся точный критерий Фишера с поправкой Бонферрони. Для обсчета значений активностей лизосомных ферментов, а также концентрации сукцинилацетона, тирозина, цистина, лизо-Гб3 и лизо-Гл1 использовался пакет программ Bruker Data Analysis 4.1, тогда как для определения чувствительности и специфичности разработанных методик применяли метод ROC-анализа согласно протоколу, предложенному Griner и соавторами<sup>23</sup>. Обсчет был реализован с помощью программы SPSS<sup>24</sup> и среды программирования R. Расчет референсных интервалов проводили с учетом рекомендаций Horn и соавторов<sup>25</sup>.

### Результаты и их обсуждение

В основу научной работы положены результаты исследований, проведенных в соответствии с разработанным нами алгоритмом, изображенным на рисунке 1. В результате селективного скрининга 31447 пациентов с подозрением на редкие болезни и 26 пациентов, протипированных вне скрининга, диагноз был поставлен 693 пациентам, что составляет 2,2% от числа поступивших. Частота обнаружения изученных в настоящей работе случаев редких болезней составила: 0,28% – для БФ, 0,94% – для БГ, 0,76% – для МПС I, 0,64% – для БП, 2,5% – для тирозинемии, тип I, 37,3% – для цистиноза, 98,6% – для НО, 91,7% – для ГБ, 47,2% – для НС, 91,0% – для КМП, что свидетельствует о высокой специфичности критериев отбора пациентов для селективного скрининга болезней с преимущественным поражением одной системы и их недостаточной специфичности – при отборе пациентов для ранней диагностики ЛБН.

<sup>19</sup> Genome Aggregation Database (gnomAD). URL: <https://gnomad.broadinstitute.org>.

<sup>20</sup> GenBank Accession. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>.

<sup>21</sup> Рыжкова О.П., и др. Руководство 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>22</sup> StatSoft. URL: [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).

<sup>23</sup> Griner P.F., et al. Selection and interpretation of diagnostic tests and procedures. Principles and applications // Ann. Intern. Med. 1981. Vol. 94, no. 4 (Pt. 2). Pp. 557–592.

<sup>24</sup> Бююль А., Цёфель П. SPSS: Искусство обработки информации. Анализ статистических данных и восстановление скрытых закономерностей : пер. с нем. СПб: ДиаСофтЮп, 2005. 608 с.

<sup>25</sup> Horn P.S., Pesce A.J. Reference intervals: an update. Review // Clin. Chim. Acta. 2003. Vol. 334, no. 1–2. Pp. 5–23.

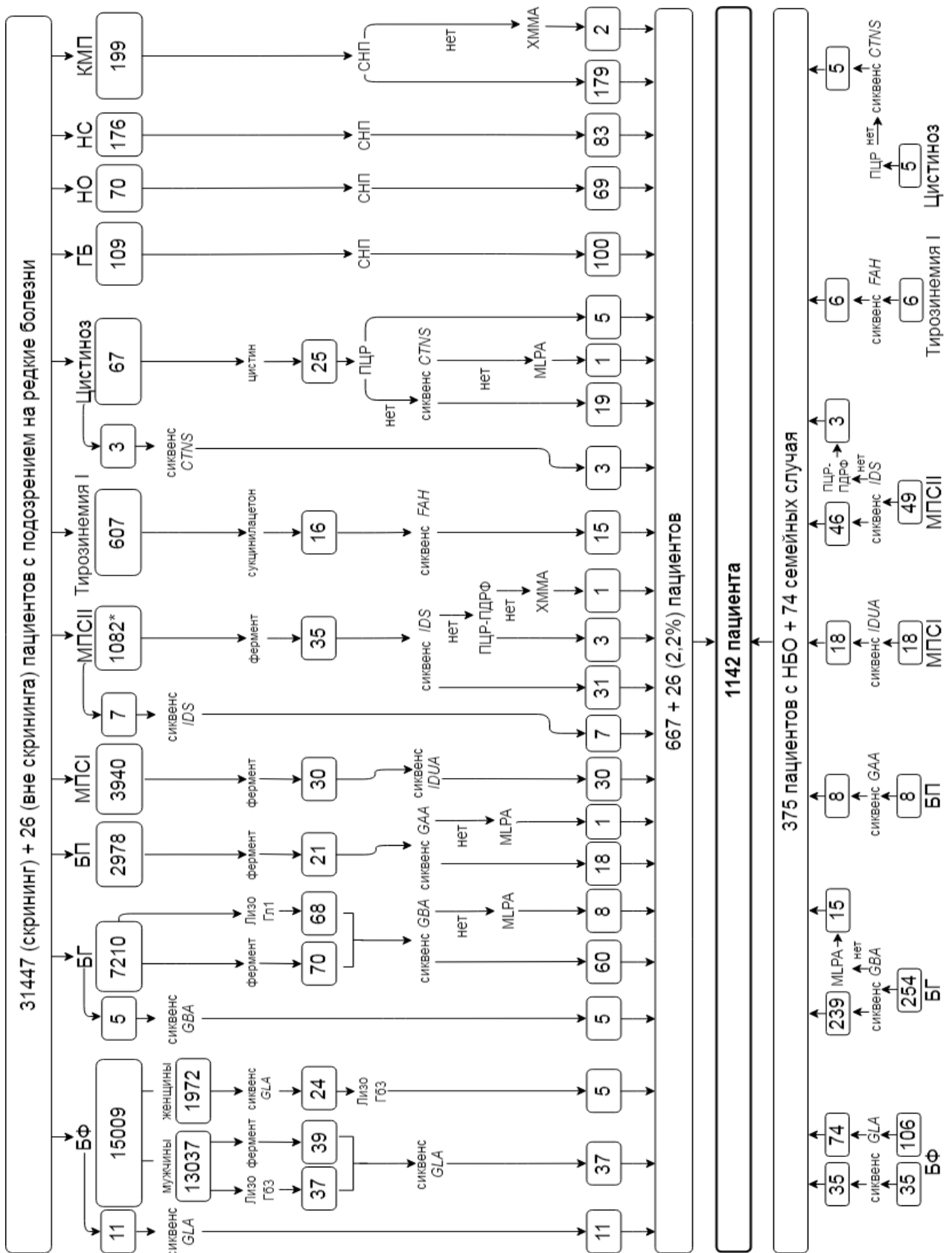


Рисунок 1 – Алгоритм молекулярной диагностики редких генетических заболеваний, изученных в настоящей работе

Примечание. \* Ферментативная диагностика МПС, тип II проводилась в лаборатории иммунологии и вирусологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

### Изучение молекулярных основ болезни Фабри у российских пациентов.

Разработанные методы тандемной масс-спектрометрии и молекулярно-генетического исследования позволили провести скрининговое обследование более 15000 пациентов с подозрением на БФ и предложить измерение концентрации биомаркера лизо-Гб3 в качестве первого этапа нового алгоритма диагностики БФ у мужчин в группах высокого риска благодаря максимальным показателям чувствительности (100%) и специфичности (100%) по сравнению с ферментативной диагностикой, имеющей меньшую чувствительность (97,3%) и специфичность (99,5%). Вместе с тем проведение исследования позволило описать географические и генетические особенности БФ у российских пациентов, определив частоту и спектр 63 различных вариантов гена *GLA* у 162 пациентов из 77 семей, пополняя базу HGMD 24 (38,1%) новыми патогенными вариантами, что составляет почти 3% всех описанных в ней мутаций гена *GLA*, вызывающих БФ. Среди новых патогенных вариантов преобладают 17 миссенс мутаций: *c.166T>A*, *p.C56S* (PS3, PM1, PM2, PM5, PP3, PP4, PP5); *c.187T>C*, *p.C63R* (PS3, PM1, PM2, PP3, PP4, PP5); *c.203T>C*, *p.L68P* (PS3, PM1, PM2, PP3, PP4); *c.400T>G*, *Y134D* (PS3, PM1, PM2, PM5, PP3, PP4, PP5); *c.508G>T*, *p.D170H* (PS3, PM1, PM2, PM5, PP3, PP4, PP5); *c.521G>A*, *p.C174R* (PS3, PM1, PM2, PM5, PP3, PP4, PP5); *c.804A>C*, *p.L268F* (PS3, PM1, PM2, PP3, PP4); *c.821G>A*, *p.G274D* (PS3, PM1, PM2, PP3, PP4); *c.844A>C*, *p.T282P* (PS3, PM1, PM2, PM5, PP3, PP4); *c.847C>A*, *p.Q283K* (PS3, PM1, PM2, PP3, PP4, PP5); *c.889T>C*, *p.S297P* (PS3, PM1, PM2, PP3, PP4, PP5); *c.895G>C*, *p.D299H* (PS3, PM1, PM2, PP3, PP4); *c.902G>T*, *p.R301L* (PS3, PM1, PM2, PM5, PP3, PP4, PP5); *c.920C>G*, *p.A307G* (PS3, PM1, PM2, PP3, PP4); *c.981A>C*, *p.Q327H* (PS3, PM1, PM2, PP3, PP4); *c.1163T>A*, *p.L388H* (PS3, PM1, PM2, PP3, PP4, PP5); *c.1211G>A*, *p.R404K* (PS3, PM1, PM2, PP4, PP5); две нонсенс мутации: *c.1134T>A*, *p.C378\** (PVS1, PS3, PM1, PM2, PP4) и *c.1197G>A*, *p.W399\** (PVS1, PS3, PM1, PM2, PP4, PP5) и четыре новые небольшие делеции: *c.539\_547+9del*, *p.L180\_G183delinsC* (PVS1, PS3, PM2, PP4); *c.786del*, *p.W262\** (PVS1, PS3, PM2, PP3, PP4, PP5); *c.834del*, *p.Q279Sfs\*3* (PVS1, PS3, PM1, PM2, PP4, PP5); *c.949del*, *p.I317Lfs\*31* (PVS1, PS3, PM1, PM2, PP4) и *c.1085\_1098del*, *p.P362Hfs\*8* (PVS1, PS3, PM1, PM2, PP4, PP5).

Впервые было показано, что у мужчин, геном которых содержит нонсенс и фреймшифт мутации гена *GLA*, существует достоверная ассоциация ( $p=0,005$ ) с развитием инсульта, при этом отношение шансов наступления инсульта у таких мужчин по сравнению с мужчинами, обладающими любыми другими мутациями гена *GLA*, составило ОШ=7,9 (ДИ 1,5–55,4) (таблица 1).

Таблица 1 – Расчет ассоциации «количественных» мутаций гена *GLA* с развитием инсульта у мужчин с БФ

Параметр	Число мужчин		р-значение (критерий Фишера)
	с инсультом	без инсульта	
Другие мутации	3	39	0,005
«Количественные» мутации	7	11	



Кроме того, были обнаружены достоверные корреляции концентрации лизо-Гб3 с ранними инсультами ( $p=0,003$ ) и с ранними инсультами у пациентов с тХПН ( $p=0,004$ ) (таблица 2). Высокие значения лизо-Гб3 (25-й перцентиль 73,1 нг/мл, медиана 95,5 нг/мл), выявленные до начала ФЗТ, могут служить неблагоприятным прогностическим фактором наступления инсультов у пациентов с БФ, отягощенной тХПН.

Нам также удалось выявить достоверные различия в концентрациях накапливаемого в лизосомах субстрата в группах пациентов, разделенных по гендерному признаку ( $p<0,001$ ) (таблица 3), а также у мужчин и женщин с БФ, распределенных по группам в зависимости от влияния типа мутации на кодируемый белок ( $p=0,015$ ) (таблица 4).

В таблицах 2, 3, 4 концентрации лизо-Гб3 представлены значениями медианы и квартилями распределения признаков (25%–75%).

Таблица 2 – Расчет корреляции (р-критерий Манна-Уитни) значений лизо-Гб3 в группе пациентов с тХПН, а также в группе пациентов с тХПН, перенесших хотя бы один инсульт

Параметр	Пациенты		р	Пациенты		р
	с тХПН	другие		с тХПН + инсульт	другие	
Концентрация лизо-Гб3, нг/мл	47,8 (19,6–66,3)	17,6 (2,5–29,0)	0,003	95,5 (73,1–101,0)	31,5 (21,0–98,0)	0,004

Таблица 3 – Расчет корреляции значений лизо-Гб3 и возраста постановки диагноза у пациентов, разделенных по гендерному признаку

Параметр	Группирующий признак		р-значение (Манна-Уитни)
	Мужчины	Женщины	
Концентрация лизо-Гб3, нг/мл	39,3 (19,1–63,4)	5,2 (1,7–6,8)	<0,001
Возраст постановки диагноза, лет	31,5 (19,0–45,0)	40,0 (25,0–54,0)	0,032

Таблица 4 – Расчет корреляции значений лизо-Гб3 у мужчин и женщин с «количественными» и любыми другими мутациями гена *GLA*

Параметр	Группирующий признак		р-значение (Манна-Уитни)
	«Количественные» мутации	Другие мутации	
Концентрация лизо-Гб3, нг/мл (мужчины)	54,8 (29,6–87,0)	25,2 (10,0–49,0)	0,017
Концентрация лизо-Гб3, нг/мл (женщины)	5,1 (4,1–10,3)	4,1 (2,1–5,9)	0,010

Более того, проведенные исследования указывают на возможное использование этого биомаркера для прогнозирования развития классической или

атипичной формы БФ у пациентов с не описанными ранее вариантами генома, а также с вариантами генома, описанными как для классической, так и для атипичной формы БФ.

Проведенное исследование позволило предложить следующую оптимизацию молекулярной диагностики БФ у российских мужчин:

1) измерение концентрации биомаркера лизо-Гб3 в сухих пятнах крови методом ВЭЖХ-МС/МС;

2) в случае получения значений концентрации лизо-Гб3, превышающих отрезную точку, – измерение активности  $\alpha$ -галактозидазы А в сухих пятнах крови методом МС/МС и поиск мутаций во всех кодирующих и прилегающих интронных областях гена *GLA* методом секвенирования по Сэнгеру.

Тогда как предлагаемая оптимизация молекулярной диагностики БФ у российских женщин должна включать следующие этапы:

1) поиск мутаций во всех кодирующих и прилегающих интронных областях гена *GLA* методом секвенирования по Сэнгеру;

2) в случае выявления мутаций гена *GLA* – измерение концентрации лизо-Гб3 методом ВЭЖХ-МС/МС.

### **Изучение молекулярных основ болезни Гоше у российских пациентов.**

Разработанные методы тандемной масс-спектрометрии и молекулярно-генетического исследования позволили провести скрининговое обследование 7210 пациентов с подозрением на БГ, выявить 68 пациентов с БГ и предложить измерение концентрации биомаркера лизо-Гл1 в качестве первого этапа нового алгоритма диагностики БГ благодаря максимальным показателям чувствительности (100%) и специфичности (100%) по сравнению с ферментативной диагностикой, имеющей меньшую специфичность (99,5%) при максимальной чувствительности (100%). Кроме того, проведенное исследование позволило описать географические и генетические особенности БГ у российских пациентов, определив доли и спектр 77 различных вариантов гена *GBA* у 327 пациентов из 311 семей, пополняя базу HGMD 26 новыми мутациями, что составляет 6,7% всех описанных в ней патогенных вариантов гена *GBA*, вызывающих развитие БГ. Среди не описанных ранее патогенных вариантов гена *GBA*, преобладали миссенс мутации (15/57,7%): *c.243T>A*, *p.S81R* (PS3, PM1, PM2, PP3, PP4); *c.344A>G*, *Q115R* (PS3, PM1, PM2, PP3, PP4); *c.375C>T*, *p.T125I* (PS3, PM1, PM2, PP3, PP4); *c.487G>C*, *p.A163P* (PS3, PM1, PM2, PP3, PP4); *c.868T>C*, *p.F290L* (PS3, PM1, PM2, PP3, PP4); *c.871A>G*, *p.T291A* (PS3, PM1, PM2, PP3, PP4); *c.892T>G*, *p.F298V* (PS3, PM1, PM2, PP3, PP4); *c.922G>C*, *p.A308P* (PS3, PM1, PM2, PP3, PP4); *c.1027T>G*, *p.Y343D* (PS3, PM1, PM2, PP3, PP4); *c.1039A>T*, *p.I347F* (PS3, PM1, PM2, PP1, PP3, PP4); *c.1052G>T*, *p.W351L* (PS3, PM1, PM2, PM5, PP4); *c.1157T>G*, *p.F386C* (PS3, PM1, PM2, PP3, PP4); *c.1177C>G*, *p.L393V* (PS3, PM1, PM2, PP3, PP4); *c.1376T>G*, *p.L459R* (PS3, PM1, PM2, PP3, PP4); *c.1381C>T*, *p.H461Y* (PS3, PM1, PM2, PP3, PP4). Вместе с тем впервые были выявлены четыре нонсенс мутации: *c.183C>A*, *p.Y61\** (PVS1, PS3, PM1, PM2, PP1, PP4); *c.407C>A*, *p.S136\** (PVS1, PS3, PM1, PM2, PP4); *c.732C>A*,

*p.Y244\** (PVS1, PS3, PM1, PM2, PP4); *c.849C>A*, *p.Y283\** (PVS1, PS3, PM1, PM2, PP4), четыре небольшие делеции: *c.334\_338del*, *p.E112Vfs\*32* (PVS1, PS3, PM2, PP4); *c.474\_485del*, *p.I158\_P161del* (PS3, PM2, PM4, PP1, PP4); *c.789del*, *p.K263Nfs\*7* (PVS1, PS3, PM2, PP4); *c.958del*, *p.L320Wfs\*16* (PVS1, PS3, PM2, PP4), одна дупликация *c.377dup*, *p.D126Efs\*20* (PVS1, PS3, PM2, PP4), одна делеция/вставка *c.822\_823delinsTT*, *p.E274\_P275delinsDS* (PS3, PM2, PM3, PM4, PP4) и одна мутация канонического сайта сплайсинга *c.116-2A>G* (PVS1, PS3, PM1, PM2, PP4). Анализ относительных частот выявленных мутаций и их расположения позволил оптимизировать молекулярно-генетическую диагностику БГ, а также показал, что мутация *c.667T>C*, обнаруженная у 39/11,9% пациентов, является характерной особенностью российской популяции, встречаясь преимущественно среди народностей, населяющих низовья Волги и Южный Урал. Среди не описанных ранее патогенных вариантов гена *GBA* следует отметить мутацию *c.1157T>G*, *p.F386C*, обнаруженную у пяти пациентов, двое из которых проживают в Чувашии, двое других – в Башкортостане, и один – в Челябинской области (близкое географическое положение может указывать на эффект основателя). Определена распространенность различных подтипов БГ среди пациентов из обследованной когорты. Доля пациентов с БГ, тип I составила 93,3%, с БГ, тип II – 0,9%, с БГ, тип III – 5,8%. Обнаружены строгие ассоциации мутации *c.1448T>C* с БГ, тип III ( $p<0,001$ ) (таблица 5) и мутации *c.1226A>G* с БГ, тип I ( $p<0,001$ ) (таблица 6).

Таблица 5 – Расчет ассоциации генотипа *c.1448T>C/c.1448T>C* гена *GBA* с развитием БГ, тип III

Параметр	Есть <i>c.1448T&gt;C/c.1448T&gt;C</i>	Нет <i>c.1448T&gt;C/c.1448T&gt;C</i>	р-значение (критерий Фишера)
БГ, тип I+тип II	5	301	<0,001
БГ, тип III	18	3	

Таблица 6 – Расчет ассоциации аллеля *c.1226A>G* гена *GBA* с развитием БГ, тип I

Параметр	Есть <i>c.1226A&gt;G</i>	Нет <i>c.1226A&gt;G</i>	р-значение (критерий Фишера)
БГ, тип I	303	0	<0,001
БГ, тип II+тип III	0	24	

Более того были обнаружены достоверные корреляции биаллельной мутации *c.1448T>C* с наиболее ранним возрастом манифестации болезни (медиана 0,7 (0,4–1)) и постановки диагноза (медиана 1,3 (1–2,1)) ( $p<0,001$ ), а биаллельной мутации *c.1226A>G* – с наиболее поздним возрастом постановки диагноза ( $p<0,001$ ) среди мажорных мутаций гена *GBA*, обнаруженных нами у российских пациентов (таблица 7).

Таблица 7 – Расчет корреляции (р-критерий Манна-Уитни) возрастных характеристик пациентов с носительством мажорных генотипов

Возраст, лет	1*	р	2*	р	3*	р	4*	р
манифестации болезни	0,7 (0,4–1)	<0,001	3 (1,3–7)	0,004	2,8 (2–4)	0,398	2,7 (2–4,3)	0,14
постановки диагноза	1,3 (1–2,1)	<0,001	12 (6–22)	0,506	26,5 (13,5–44,5)	<0,001	22 (7,4–43)	0,02

Примечания. 1. Цифрами обозначены генотипы: 1\* – *c.1448T>C/c.1448T>C*; 2\* – *c.1226A>G/c.1448T>C*; 3\* – *c.1226A>G/c.1226A>G*; 4\* – *c.667T>C/c.1226A>G*. 2. Возрастные характеристики представлены значениями медианы и квартилями распределения признаков (25%–75%).

Проведенное исследование позволило предложить следующую оптимизацию молекулярной диагностики БГ у российских пациентов:

1) измерение концентрации биомаркера лизо-Гл1 в сухих пятнах крови методом ВЭЖХ-МС/МС;

2) в случае получения значений концентрации лизо-Гл1, превышающих отрезную точку, – измерение активности β-D-глюкоцереброзидазы в сухих пятнах крови методом МС/МС и поиск мажорных мутаций *c.1226A>G*, *c.1448T>C* и *c.667T>C* гена *GBA* с использованием лонг-рэндж ПЦР на начальном этапе;

3) в случае невыявления биаллельных мутаций гена *GBA* – секвенирование всех кодирующих и прилегающих интронных областей гена *GBA* с использованием лонг-рэндж ПЦР на начальном этапе;

4) в случае невыявления биаллельных мутаций гена *GBA* после третьего этапа – анализ протяженных делеций, дупликаций и перестроек между геном *GBA* и псевдогеном *GBAP* методом MLPA.

**Изучение молекулярных основ мукополисахаридоза, тип I у российских пациентов.** Разработанный метод ферментативной диагностики МПС I позволил осуществить селективный скрининг 3940 пациентов с подозрением на МПС I и выявить 30 новых случаев болезни, тогда как разработанный метод молекулярно-генетической диагностики мутаций гена *IDUA* позволил подтвердить эти случаи, а также способствовал обнаружению патогенных вариантов у 16 пациентов, обнаруженных ранее посредством биохимического анализа. Результаты дальнейшей научной работы позволили описать возрастные, географические и генотип-фенотипические характеристики 46 российских пациентов с МПС I. Клиническая картина пациентов, страдающих МПС I в целом соответствует данным зарубежных специалистов<sup>26</sup>. Определена распространенность различных подтипов МПС I среди пациентов из обследованной когорты. Доля пациентов с МПС, тип IH составила 67,4%, с МПС, тип IH-S – 16,3%, с МПС, тип IS – 16,3%. Выявлен спектр и относительные частоты 30 различных вариантов гена *IDUA*, среди которых обнаружена мажорная мутация *p.Q70\**, характерная для российских больных, на основе чего была предложена оптимизация алгоритма молекулярной диагностики МПС I.

<sup>26</sup> Beauchamp N.J., et al. High frequency of missense mutations in glycogen storage disease type VI // J. Inherit. Metab. Dis. 2007. Vol. 30, no. 5. Pp. 722–734.

При получении лабораторией дегидратированных пятен крови, изъятых у российских пациентов с подозрением на МПС I, может быть предложена следующая оптимизация диагностики:

1) измерение ферментативной активности  $\alpha$ -L-идуронидазы в сухих пятнах крови методом МС/МС;

2) в случае сниженной активности  $\alpha$ -L-идуронидазы – поиск мажорной мутации *c.208C>T* гена *IDUA*;

3) в случае отсутствия биаллельной мутации *c.208C>T* – секвенирование всех кодирующих и прилегающих интронных областей гена *IDUA*.

Описаны мутации, обнаружение которых позволяет прогнозировать развитие тяжелого и мягкого фенотипа среди российских пациентов с МПС I. Так, мутации *p.W47\**, *p.Q70\**, *p.Q71\**, *p.W402\**, *p.Q63\**, *p.Y581\**, *c.1A>C*, *c.3G>A*, *p.A75Cfs\*55*, *p.A170Tfs\*15*, *p.P228Hfs\*6*, *p.A367Rfs\*70*, *p.T388Nfs\*11*, *p.D413\_L421del*, *p.V595Gfs\*64* ассоциированы с формированием тяжелого фенотипа МПС I. Тогда как варианты *p.T293\_Y296dup*, *p.Q380R*, *p.A570V* и *p.Q563P* ассоциированы с формированием мягкого фенотипа. Выявлены достоверные различия по возрасту манифестации болезни и значениям ферментативной активности в группах пациентов с синдромом Гурлер ( $p=0,005$  и  $p<0,001$  соответственно) и синдромом Шейе ( $p=0,016$  и  $p=0,018$  соответственно) (таблица 8).

Таблица 8 – Расчет корреляций (р-критерий Манна-Уитни) возраста манифестации и ферментативной активности с различными подтипами МПС I у российских пациентов

Показатель	S	Осталь- ные	p	p*	H-S	Осталь- ные	p	p*	H	Осталь- ные	p	p*
Возраст манифестации, месяцы	24,0 (12,0–24,0)	4,0 (1,0–5,0)	0,008	0,016	9,0 (3,5–34,5)	4,5 (1,0–5,0)	0,147	0,294	3,0 (1,0–5,0)	19,4 (6,0–24,0)	0,002	0,005
Значение активности фермента, мкмоль/л/час	1,2 (1,0–1,5)	0,3 (0,2–0,6)	0,009	0,018	1,0 (0,9–1,0)	0,26 (0,2–0,6)	0,022	0,045	0,25 (0,2–0,4)	1,0 (0,9–1,1)	<0,001	<0,001

Примечание. 1.  $p^*$  – поправка на множественное сравнение (Бонферрони). 2. S – синдром Шейе, H-S – синдром Гурлер-Шейе, H – синдром Гурлер. 3. Возрастные и биохимические характеристики представлены значениями медианы и квартилями распределения признаков (25%–75%).

Вместе с тем было установлено, что дети с мажорным генотипом *p.Q70\*/p.Q70\** имеют повышенный риск манифестации болезни в возрасте до 3 месяцев ОШ=27,5 (ДИ 3,2–283,5) ( $p<0,001$ ) (таблица 9).

Таблица 9 – Расчет ассоциации возраста манифестации МПС I с генотипом *p.Q70\*/p.Q70\**

Возраст манифестации болезни	Пациенты		p-значение (критерий Фишера)
	с генотипом <i>p.Q70*/p.Q70*</i>	с другими генотипами	
≤ 3 месяцев	11	2	<0,001
> 3 месяцев	2	10	

Впервые в мире нам удалось описать 17 новых патогенных вариантов гена *IDUA*, что пополняет базу HGMD на 6,3%, и подтипы МПС I, вызываемые этими вариантами у обследованных нами пациентов. Это пять новых миссенс вариантов: *c.718C>G*, *p.H240D* (PS3, PM2, PM3, PP3, PP4, PP5); *c.1459T>C*, *p.W487R* (PS3, PM2, PM3, PP3, PP4); *c.1595T>G*, *L532R* (PS3, PM2, PM3, PP3, PP4); *c.1688A>C*, *p.Q563P* (PS3, PM2, PM3, PP3, PP4); *c.1709A>T*, *p.A570V* (PS3, PM1, PM2, PP3, PP4); две нонсенс мутации: *c.141G>A*, *p.W47\** (PVS1, PS3, PM2, PP4); *c.211C>T* *p.Gln71\** (PVS1, PS3, PM1, PM2, PP4); пять делеций: *c.222\_226del*, *p.A75Cfs\*55* (PVS1, PS3, PM2, PP4); *c.705\_707del*, *p.W235\_G236delinsC* (PS3, PM2, PM3, PM4, PP4); *c.967\_969del*, *p.V323del* (PS3, PM2, PM3, PM4, PP4); *c.1099\_1108del*, *p.A367Rfs\*70* (PVS1, PS3, PM2, PP1, PP4); *c.1238\_1264del*, *p.D413\_L421del* (PS3, PM2, PM3, PM4, PP4); три вставки: *c.507\_508insACCTTGA*, *p.A170Tfs\*15* (PVS1, PS3, PM2, PP4); *c.1162dup* *p.T388Nfs\*11* (PVS1, PS3, PM2, PP4); *c.1781dup*, *p.V595Gfs\*64* (PVS1, PS3, PM2, PP4) одна делеция/вставка *c.1873\_1888delinsACA*, *p.Y625Tfs\*?* (PVS1, PS3, PM2, PP4) и одна мутация стартового кодона *c.3G>A*, *p.?* (PVS1, PS3, PM2, PP4).

**Изучение молекулярных основ синдрома Хантера у российских пациентов.** Значительный полиморфизм гена, кодирующего идуронат-2-сульфатазу, среди пациентов с синдромом Хантера, проживающих на территории РФ, может объясняться значительной популяционной вариабельностью, тогда как отсутствие частых мутаций по всей видимости связано с X-сцепленным механизмом наследования, для которого, как было показано нами ранее на примере российских пациентов с БФ, характерна невысокая частота повторяемости одних и тех же нуклеотидных вариантов в неродственных семьях. В ходе проведения исследования протипирован 91 пациент с синдромом Хантера, из которых 42 пациента выявлены в результате селективного скрининга, определены частоты и спектр 64 различных патогенных вариантов гена *IDS*, 29 из которых не были описаны ранее в базе данных HGMD, что может пополнить ее на 4,5%. В частности, были выявлены восемь новых миссенс мутаций: *c.133G>T*, *p.D45Y* (PS3, PM1, PM2, PM5, PP3, PP4); *c.427C>T*, *p.S143P* (PS3, PM1, PM2, PM5, PP3, PP4); *c.445T>C*, *p.S149P* (PS3, PM1, PM2, PP3, PP4); *c.512G>A*, *p.C171Y* (PS3, PM1, PM2, PM5, PP3, PP4); *c.590C>T*, *p.P197L* (PS3, PM1, PM2, PM5, PP3, PP4); *c.697A>G*; *p.R233G* (PS3, PM1, PM2, PP3, PP4, PP5); *c.703C>A*, *p.P235T* (PS3, PM1, PM2, PP3, PP4); *c.1028G>T*, *p.G343V* (PS3, PM1, PM2, PP3, PP4). Более того, были выявлены 4 неописанные нонсенс мутации: *c.598C>T*, *p.Q200\** (PVS1, PS3, PM2, PP4); *c.918T>G*, *p.Y306\** (PVS1, PS3, PM1, PM2, PP4); *c.998C>A*, *p.S333\** (PVS1, PS3, PM1, PM2, PP4); *c.1288G>T*, *p.E430\** (PVS1, PS3, PM2, PP4). Также удалось обнаружить 10 небольших делеций, приводящих к сдвигу рамки считывания: *c.305del*, *p.L102Rfs\*28* (PVS1, PS3, PM2, PP4); *c.613del* *p.A205Pfs\*8* (PVS1, PS3, PM1, PM2, PP4); *c.687del*, *p.H229Qfs\*51* (PVS1, PS3, PM2, PP4); *c.715\_721del*, *p.Q239Cfs\*39* (PVS1, PS3, PM2, PP4); *c.800\_801del*, *p.W267Rfs\*74* (PVS1, PS3, PM2, PP4); *c.1028del*, *G343Efs\*17* (PVS1, PS3, PM2, PP4); *c.1077del*, *p.I360Rfs\*31* (PVS1, PS3, PM2, PP4); *c.1214\_1220del*, *p.S405Ffs\*33* (PVS1, PS3, PM1, PM2, PP4); *c.1438\_1442del*, *p.P480Ffs\*17* (PVS1, PS3, PM2, PP4); *c.1466del*,

*p.G489Afs\*7* (PVS1, PS3, PM2, PP4), одну неописанную интронную делецию, оказывающую влияние на сплайсинг: *c.880-2del* (PVS1, PS3, PM2, PP4), две новые дупликации, сдвигающие рамку считывания: *c.39\_55dup*, *p.S19Wfs\*5* (PVS1, PS3, PM2, PP4); *c.776\_777dup*, *p.P260Yfs\*21* (PVS1, PS3, PM2, PP4), одну новую вставку/делецию: *c.812\_830delinsTC*, *p.R271Ifs\*65* (PVS1, PS3, PM2, PP4) и три мутации, нарушающие канонические сайты сплайсинга: *c.419-2A>G* (PVS1, PS3, PM1, PM2, PP4), *c.1006+2T>G* (PVS1, PS3, PM2, PP4) и *c.1181-2A>G* (PVS1, PS3, PM1, PM2, PP4).

Кроме того, удалось описать фенотип пациентов с патогенными вариантами гена *IDS*, не описанными ранее. Выявлена достоверная ассоциация развития аномалий клапанов сердца и/или КМП ( $p=0,015$ ), карпального туннельного синдрома ( $p=0,003$ ) со средней и тяжелой степенью интеллектуальной недостаточности. При этом носители средней и тяжелой степени интеллектуальной недостаточности имеют восьмикратное превышение риска развития аномалий клапанов сердца и КМП ОШ=8,00 (ДИ 1,59–40,38) и карпального туннельного синдрома ОШ=12,80 (ДИ 2,39–68,41) по сравнению с пациентами с легкой степенью интеллектуальной недостаточности. Вместе с тем была обнаружена связь мутаций, сдвигающих рамку считывания и миссенс мутаций с развитием аномалии клапанов сердца и/или КМП (таблица 10).

Таблица 10 – Расчет ассоциации (р-критерий Фишера) мутаций гена *IDS*, сдвигающих рамку считывания, а также миссенс мутаций с развитием аномалии клапанов сердца и/или КМП у пациентов с синдромом Хантера

Показатель	Фрэймшифт мутация		р	Миссенс мутация		р
	есть	нет		есть	нет	
Аномалии клапанов сердца и/или КМП	16	20	0,020	14	22	0,008
Нет аномалий клапанов сердца и/или КМП	1	12		11	2	

При этом обладатели фрэймшифт мутаций гена *IDS* имеют повышенный риск развития аномалий клапанов сердца и/или КМП ОШ=9,60 (ДИ 1,13–81,87), тогда как обладатели миссенс мутаций гена *IDS* имеют пониженный риск развития этого фенотипического признака ОШ=0,12 (ДИ 0,02–0,60).

#### **Изучение молекулярных основ болезни Помпе у российских пациентов.**

Разработанный метод диагностики БП позволил провести селективный скрининг 2978 пациентов с подозрением на БП, выявить 19 новых случаев этой редкой болезни, описать клинические и возрастные особенности, а также спектр и относительные частоты 32 патогенных вариантов гена *GAA* у 27 российских пациентов с БП. Большинство нонсенс мутаций и делеций, сдвигающих рамку считывания, в нашем исследовании коррелирует с младенческой формой и тяжелой клинической картиной БП, в то время как наличие сплайсинговой мутации *c.-32-13T>G* коррелирует с поздним дебютом БП (таблица 11).

Таблица 11 – Расчет корреляции возрастных особенностей БП со сплайсинговой мутацией *c.-32-13T>G*

Возраст, месяцы	Мутация <i>c.-32-13T&gt;G</i>	Другие мутации	p-значение (Манна-Уитни)
манифестации	219 (3–362)	2 (0,03–6)	<0,001
диагностики	468 (372–607)	10 (4–130)	<0,001

У девяти пациентов (33,3%) были выявлены девять (28,1%) не описанных в базе HGMD вариантов гена *GAA*, среди которых преобладали пять новых патогенных миссенс мутаций: *c.1292T>C*, *p.L431P* (PS3, PM1, PM2, PP3, PP4) в гомозиготном состоянии у девочки с младенческой формой БП; *c.2853G>T*, *p.W951C* (PS3, PM2, PM3; PP3, PP4), *c.625T>C*, *p.Y209H* (PS3, PM1, PM2, PP3, PP4), *c.1109G>A*, *p.G370D* (PS3, PM2, PM3, PP3, PP4) у мальчиков с младенческой БП; *c.1448G>A*, *p.G483E* (PS3, PM1, PM2, PM5, PP3, PP4) у женщины с поздним началом БП. Три патогенные делеции, приводящие к сдвигу рамки считывания: *c.1030\_1039del*, *p.G344Pfs\*45* (PVS1, PS3, PM2, PP4); *c.2011\_2012del*, *p.M671Afs\*65* (PVS1, PS3, PM2, PP4) и *c.2740del*, *p.Q914Sfs\*29* (PVS1, PS3, PM2, PP4) были выявлены у трех пациентов с младенческой формой БП. Причем последний вариант был обнаружен в гомозиготном состоянии. Кроме того, одна патогенная нонсенс мутация *c.1961C>G*, *p.S654\** (PVS1, PS3, PM1, PM2, PP4) была обнаружена у женщины с мягкой формой БП с поздним началом, что, по видимости, обусловлено ее компаунд гетерозиготным состоянием со сплайсинговым вариантом *c.-32-13T>G*.

Проведение исследования позволило предложить следующую оптимизацию молекулярной диагностики БП у российских пациентов:

- 1) измерение активности кислой  $\alpha$ -1,4-глюкозидазы в сухих пятнах крови методом МС/МС;
- 2) в случае сниженной активности фермента – поиск трех наиболее частых мутаций *c.-32-13T>G*, *c.2662G>T* и *c.307T>G* гена *GAA*;
- 3) в случае не выявления этих биаллельных вариантов – поиск мутаций во всех кодирующих и прилегающих интронных областях гена *GAA*;
- 4) в случае не выявления биаллельных патогенных вариантов гена *GAA* – поиск протяженных делеций и дупликаций методом MLPA.

**Изучение молекулярных основ цистиноза у российских пациентов.** Наилучшим своевременным способом выявления нефропатического цистиноза мог бы служить неонатальный скрининг, однако, большой объем крови, требуемый для проведения исследования, и вероятность получения ложноотрицательных значений цистина у младенцев<sup>27</sup>, пока не позволяют включить цистиноз в соответствующие программы скрининга. Проведенное нами исследование является первым в России примером селективного скрининга цистиноза, позволившего выявить 25 новых случаев этого редкого заболевания и описать возрастные и географические особенности болезни у российских детей.

<sup>27</sup> Ferreira F, Leal I, Sousa D, Costa T. CTNS Molecular genetics profile in a Portuguese cystinosis population // Open J. Genet. 2018. Vol. 8, no. 4. Pp. 91–100.



Разработанные методы молекулярной диагностики цистиноза, включающие измерение концентрации цистина и последующее генетическое исследование позволили, в свою очередь, описать спектр и доли 15 различных патогенных и одного вероятно патогенного вариантов гена, кодирующего цистинозин, у 33 российских детей, семь из которых оказались не описанными в мире ранее, что пополняет базу HGMD на 4,7%. Наибольшей частотой среди новых вариантов обладает нонсенс мутация *c.785G>A*, *p.W262\** (PVS1, PS3, PM2, PP4), встретившаяся у двух мальчиков с манифестацией болезни в возрасте 6 и 10 месяцев в гетерозиготном состоянии и двух девочек с началом болезни в 7 и 15 месяцев в гомозиготном и гетерозиготном вариантах, а также нонсенс мутация *c.433C>T*, *p.Q145\** (PVS1, PS3, PM2, PP4), обнаруженная у четырех мальчиков из Московской области, Оренбургской области, Мордовии и Коми с манифестацией болезни в промежутке от 3 до 18 месяцев. Еще два новых патогенных нонсенс варианта: *c.450G>A*, *p.W150\** (PVS1, PS3, PM1, PM2, PP4), выявленный в гомозиготном состоянии у мальчика из Хабаровского края и *c.413G>A*, *p.W138\** (PVS1, PS3, PM1, PM2, PP4), обнаруженный в гетерозиготном состоянии у мальчика из Республики Мордовия. Оба случая инфантильной формы цистиноза манифестировали в возрасте 7 месяцев. Среди других неописанных патогенных вариантов были выявлены: гомозиготная дупликация *c.140+2dup* (PVS1, PS3, PM2, PP4), оказывающая влияние на сплайсинг, у девочки с мягкой подростковой формой цистиноза, гетерозиготная делеция одного нуклеотида, приводящая к сдвигу рамки считывания *c.1000del*, *p.T334Pfs\*65* (PVS1, PS3, PM2, PP4) у мальчика с тяжелым течением инфантильной формы цистиноза в компаунд-гетерозиготном состоянии с протяженной делецией, длиной 57 т.п.н., и гомозиготный вероятно патогенный миссенс вариант *c.627C>A*, *p.S209R* (PS3, PM2, PP3, PP4) у мальчика с мягкой подростковой формой цистиноза.

Были выявлены мутации, характерные для определенных этносов, населяющих территорию РФ, что наряду с данными биохимического исследования позволило предложить оптимизацию диагностики цистиноза:

1) измерение концентрации цистина в лейкоцитах периферической крови методом ВЭЖХ-МС/МС;

2) в случае определения концентрации цистина, превышающей отрезную точку, поиск пяти частых мутаций гена *CTNS*: делеции, длиной 57 т.п.н., *c.518A>G*, *c.1015G>A*, *c.433C>T* и *c.785G>A* (для представителей чеченского этноса молекулярно-генетическое исследование необходимо начинать с поиска мутации *c.518A>G*, тогда как для карачаевцев – с поиска мутации *c.1015G>A*);

3) в случае невыявления частых биаллельных вариантов гена *CTNS*, поиск мутаций во всех кодирующих и прилегающих интронных областях гена *CTNS* методом секвенирования по Сэнгеру;

4) в случае невыявления биаллельных мутаций гена *CTNS* после третьего этапа диагностики – поиск делеций и дупликаций методом MLPA.

Статистически достоверные различия ( $p=0,003$ ) были выявлены между высокими концентрациями цистина в группе пациентов с гомозиготными: делецией, длиной 57 т.п.н., нонсенс мутациями *c.283G>T*, *c.433C>T*, *c.785G>A* и не таким значительным превышением референсных концентраций цистина в

полиморфноядерных лейкоцитах периферической крови пациентов с гомозиготными миссенс мутациями: *c.518A>G*, *c.627C>A*, *c.1015G>A* гена *CTNS* (таблица 12).

Таблица 12 – Расчет корреляции уровня цистина с определенными типами мутаций гена *CTNS* у российских детей с цистинозом

Параметр	Пациенты с гомозиготными мутациями		р-значение (Манна-Уитни)
	миссенс	нонсенс	
Концентрация цистина, $\frac{1}{2}$ цистина/мг белка	3,2 (2,9–3,2)	6,5 (5,9–7,3)	0,003

*Примечание.* Концентрации цистина представлены значениями медианы и квартилями распределения признаков (25%–75%).

Именно ранняя диагностика и раннее начало комплексной терапии, совмещающей в себе симптоматическую и патогенетическую терапию, а также продолжение последней в течение всей жизни пациента, имеет первостепенное значение для обеспечения лучшего контроля над цистинозом, мониторируемого посредством измерения концентрации цистина, предотвращая существенное замедление роста и задерживая наступление тХПН и других осложнений.

**Изучение молекулярных основ тирозинемии, тип I у российских пациентов.** Разработанные методы биохимической и молекулярно-генетической диагностики тирозинемии, тип I, позволили провести исследование биологических образцов, изъятых у 607 пациентов и выявить 15 детей, у 14 из которых была диагностирована хроническая форма этого редкого заболевания и у одного ребенка – острая форма, а также описать спектр и частоту 11 различных мутаций гена *FAH* у 21 пациента с тирозинемией, тип I, четыре из которых не имели описания в базе данных HGMD до проведения настоящего исследования, что пополняет эту базу на 4%. Чаще других встречался вариант *c.1090G>C*, *p.E364Q* (PS3, PM1, PM2, PM5, PP3, PP4, PP5), обнаруженный в двух семьях из Бурятии и в одной семье из Якутии. Впервые мы описали этот вариант в 2015 году<sup>28</sup>, после чего наши соотечественники установили, что частота носительства этой мутации среди якутов составляет 1%, предположив, что частота тирозинемии, тип I в Якутии может составлять 1 случай на 10000 живых новорожденных<sup>29</sup>. По всей видимости, близкое расположение этих регионов и гомозиготность выявленных вариантов у трех детей из неродственных семей может указывать как на высокое носительство этой мутации, что было показано в Якутии, связанное с возможным эффектом основателя, так и на высокую вероятность близкородственных браков у родителей обследованных детей. Вариант *c.998A>C*, *p.H333P* (PS3, PM1, PM2, PP3, PP4), не описанный ранее,

<sup>28</sup> Светличная Д., и др. Биохимическая и молекулярно-генетическая диагностика тирозинемии, тип I // Медицинская генетика. 2015. Т. 14, № 1. С. 13.

<sup>29</sup> Maksimova N.R., et al. A novel homozygous mutation causing hereditary tyrosinemia type I in Yakut patient in Russia: case report // Wiad. Lek. 2016. Vol. 69, no. 2 (Pt 2). Pp. 295–298.

встретился единожды у пациента из Ростовской области. Вариант *c.608C>A p.A203D* (PS3, PM2, PM3, PP3, PP4) был выявлен у пациента из Санкт-Петербурга, тогда как вариант *c.614T>C, p.F205S* (PS3, PM2, PM3, PP3, PP4) – у пациента из Чувашии.

Были выявлены мутации, характерные для определенных этносов, населяющих территорию РФ, что наряду с данными биохимического исследования позволило предложить оптимизацию диагностики тирозинемии, тип I у российских детей:

1) измерение концентрации сукцинилацетона в сухих пятнах крови методом МС/МС;

2) в случае определения значений сукцинилацетона, превышающих отрезную точку, – поиск трех наиболее частых мутаций *c.554-1G>T*, *c.1025C>T* и *c.1090G>C*, гена *FAH* (для представителей чеченского этноса молекулярно-генетическое исследование рекомендуется начинать с поиска мутации *c.1025C>T*, тогда как для жителей Якутии и Бурятии – с мутации *c.1090G>C*);

3) в случае невыявления биаллельных мутаций – поиск мутаций во всех кодирующих и прилегающих интронных областях гена *FAH* методом секвенирования по Сэнгеру.

Более того, удалось описать клинические и возрастные характеристики российских детей с тирозинемией, тип I, продемонстрировав успешность патогенетического лечения пациентов и мониторингования уровней сукцинилацетона и тирозина в сухих пятнах крови.

На смену простым и наиболее точным к настоящему времени методам секвенирования фрагментов ДНК, средней длиной 500–700 п.н., пришли высокопроизводительные методы СНП, позволяющие прочитывать до десятков млрд.п.н. в течение нескольких часов. При этом усложнилась пробоподготовка и расшифровка результатов исследования. Однако, благодаря преимуществам этих новейших технологий, нам удалось разработать тест-системы, позволяющие одновременно анализировать таргетные области генома, содержащие несколько десятков генов, оптимизируя временные и материальные ресурсы. При этом от ложноположительных результатов СНП удалось избавиться путем проверки выявленных генетических вариантов с помощью секвенирования по Сэнгеру.

**Изучение молекулярных основ гликогеновых болезней у российских пациентов.** В большинстве случаев биохимическое исследование биопсийного материала печени, либо мышцы не представляется возможным, тогда как проведение молекулярно-генетической диагностики методом секвенирования по Сэнгеру стоит дорого и занимает много времени ввиду значительной генетической гетерогенности ГБ. Все это может привести к несвоевременному оказанию медицинской помощи больным детям и постановке ошибочного диагноза на основе клинической картины болезни. В основном встречаются публикации, посвященные изучению генов *G6PC* и *SLC37A4*, мутации в которых вызывают развитие ГБ, тип Ia и ГБ, тип Ib соответственно, что связано с небольшой протяженностью этих генов. Тогда как структура и частота встречаемости других типов ГБ в целом довольно плохо изучены.

В 2015 году нами был разработан метод мультиплексной молекулярной диагностики всех 15 типов ГБ, упомянутых к настоящему моменту времени в базе данных OMIM. Разработанный метод открыл возможности одновременного поиска мутаций в кодирующих и прилегающих интронных областях 20 генов: *GYS2*, *GYS1*, *G6PC*, *SLC37A4*, *GAA*, *AGL*, *GBE1*, *PYGM*, *PYGL*, *PFKM*, *PHKA2*, *PHKB*, *PHKG2*, *PHKA1*, *PGAM2*, *PGM1*, *LDHA*, *ALDOA*, *ENO3* и *GYG1* на основе технологии ЧНП. Проведенное исследование помогло поставить точный клинический диагноз 100 (91,7%) детям из 109 пациентов с подозрением на ГБ. Биоматериал от пациентов с подозрением на ГБ II типа направлялся в нашу лабораторию в рамках другого селективного скрининга, подвергаясь ферментативной и молекулярно-генетической диагностике, и описан в этой работе ранее. В результате этого исследования было описано еще 27 больных, учтенных в этой главе для суммарного описания всех выявленных типов ГБ, обнаруженных у 127 российских пациентов: 84 (66,1%) мужчины и 43 (33,9%) женщины, средний возраст которых составил 9 лет, медиана – 8 лет, стандартное отклонение – 7 лет на момент окончания исследования.

Разработанный метод молекулярной диагностики ГБ позволил выявить 85 различных вариантов генома в восьми изученных генах. Благодаря проведенному анализу полученных данных, впервые удалось описать относительные частоты различных типов ГБ у российских детей (рисунок 2), определить возрастные и географические особенности развития ГБ, а также описать 62 новых варианта изученных генов, из которых 28 вариантов были отнесены к категории патогенных, 26 вариантов – к категории вероятно патогенных, патогенность восьми вариантов биоинформатическими методами анализа определить не удалось.

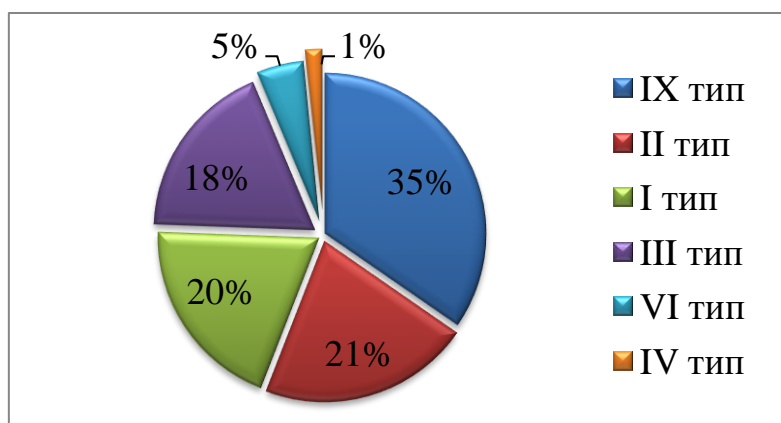


Рисунок 2 – Относительные частоты различных типов ГБ у обследованных российских детей

Среди 28 патогенных вариантов, неописанных ранее, восемь вариантов были выявлены в гене *PHKA2*: *c.3613C>A*, *p.P1205T* (PS2, PM2, PM5, PP3, PP4); *c.919-2A>G* (PVS1, PM2, PP4); *c.1294\_1295del*, *p.T432Ffs\*5* (PVS1, PM2, PP4); *c.3235\_3238dup*, *p.V1080Efs\*39* (PVS1, PM2, PP4); *c.3570dup*, *p.D1191Rfs\*12* (PVS1, PM2, PP4); *c.903T>G*, *p.W301\** (PVS1, PM2, PP4); *c.3277C>T*, *p.Q1093\** (PVS1, PM2, PP4); *c.3016G>T*, *p.E1006\** (PVS1, PM2, PP4); три варианта в гене *AGL*: *c.1218T>A*, *p.W406\** (PVS1, PM2, PP4); *c.665-2A>G* (PVS1, PM2, PP4);

*c.296del, p.N99Mfs\*9* (PVS1, PM1, PM2, PP4); четыре варианта в гене *SLC37A4*: *c.345dup p.L116Afs\*15* (PVS1, PM2, PP4); *c.1077\_1078insG, p.N360Efs\*42* (PVS1, PM2, PP4); *c.413G>A p.W138\** (PVS1, PM2, PP4); *c.2T>C, p.M1?* (PVS1, PM2, PP4); четыре нуклеотидных варианта в гене *PHKB*: *c.594+1G>A* (PVS1, PM2, PP4); *c.39G>A, p.W13\** (PVS1, PM2, PP4), *c.1257T>G, p.Y419\** (PVS1, PM2, PP4) *c.2014C>T, p.R672\** (PVS1, PM2, PP4); еще девять, описанных выше патогенных вариантов, удалось обнаружить в гене *GAA*.

Проведенное исследование позволило предложить оптимизацию молекулярной диагностики ГБ, начиная с исследования мутаций *c.247C>T* гена *G6PC*, *c.1042\_1043del* и *c.1016G>T* гена *SLC37A4*, с последующим исследованием таргетных областей 20 изученных нами генов методом СНП в случае невыявления биаллельных мажорных мутаций.

Несмотря на существенное число проанализированных пациентов, достоверные корреляции генотипа и фенотипа удалось установить лишь для детей с ранней манифестацией ГБ в возрасте до 6 месяцев и мутациями гена *AGL*, преждевременно прерывающими синтез кодируемого белка (таблица 13).

Таблица 13 – Расчет ассоциации возраста манифестации ГБ с различными типами мутаций гена *AGL*

Возраст манифестации болезни	Число вариантов		р-значение (критерий Фишера)
	нонсенс/фрэймшифт	миссенс	
≤ 6 месяцев	11	2	0,028
> 6 месяцев	8	10	

Таким образом, дети, страдающие ГБ, вызванной мутациями, приводящими к преждевременной терминации трансляции, обладают повышенным риском раннего дебюта заболевания ОШ=7,0 (ДИ 1,1–82,5).

**Изучение молекулярных основ несовершенного остеогенеза у российских пациентов.** В 2014 году нами была разработана тест-система, позволяющая анализировать кодирующие и прилегающие интронные области генов *COL1A1*, *COL1A2*, *IFITM5*, *CRTAP*, *LEPRE1*, *P3H1*, *PPIB*, *SERPINF1*, *CRTAP*, *SERPINH1*, *FKBP10*, *SP7*, *BMP1*, *TMEM38B*, *WNT1*, *CREB3L1*, *SPARC*, позднее пополнившаяся таргетными областями генов *TENT5A*, *MBTPS2* и *MESD*, мутации которых вызывают НО. Благодаря разработанной методике были протипированы 70 пациентов с подозрением на НО, в результате чего патогенные варианты генома были выявлены у 69 больных детей из 65 российских семей, что доказало 100% эффективность метода молекулярной диагностики НО, так как переломы ребенка с подозрением на НО и отсутствием мутаций в анализируемых таргетных областях генома были вызваны остеопетрозом.

Разработанный метод молекулярной диагностики НО позволил обнаружить 52 различных патогенных и четыре вероятно патогенных варианта в четырех исследованных генах и описав 23 новых варианта. Это 16 новых вариантов в гене *COL1A1*. Среди них четыре патогенных миссенс варианта: *c.617G>A, p.G206D* (PS2, PM1, PM2, PP3, PP4); *c.977G>T, p.G326V* (PS2, PM2, PM5, PP3, PP4);

*c.1040G>A, p.G347D* (PS2, PM1, PM2, PP3, PP4); *c.2272G>A, p.G758S* (PS2, PM2, PM5, PP3, PP4); два вероятно патогенных миссенс варианта: *c.3877A>G, p.M1293V* (PM1, PM2, PP1, PP3, PP4); и *c.4328C>T, p.A1443V* (PM1, PM2, PP1, PP3, PP4) одна нонсенс мутация: *c.1900C>T, p.Q634\** (PVS1, PM1, PM2, PP1, PP4); одна делеция: *c.2418del, p.G809Afs\*299* (PVS1, PM2, PP1, PP4); четыре дупликации: *c.299dup, p.S101Vfs\*68* (PVS1, PM2, PP1, PP4), *c.494dup, p.Y165\** (PVS1, PM2, PP4), *c.578dup, p.G194Wfs\*14* (PVS1, PM2, PP1, PP4) и *c.1551\_1554dup, p.P519Wfs\*20* (PVS1, PS2, PM2, PP4) и четыре мутации канонических сайтов сплайсинга *c.642+1G>C* (PVS1, PS2, PM2, PP4); *c.751-2A>T* (PVS1, PM2, PP1, PP4); *c.2128-2A>C* (PVS1, PM2, PP4) и *c.3815-1G>A* (PVS1, PS2, PM2, PP4). Каждая из этих новых мутаций встретилась в единичных семьях. Для вариантов *c.578dup, p.G194Wfs\*14, c.2418del, p.G809Afs\*299; c.1900C>T, p.Q634\*, c.3877A>G, p.M1293V* и *c.299dup, p.S101Vfs\*68* была установлена сегрегация мутаций по отцовской линии, сопровождаемая мягким течением НО, тип I у пробандов и их отцов с небольшим количеством переломов, нормальным ростом, нормальными склерами, здоровыми зубами и с увеличенной минерализацией костной ткани. Помимо этого, четыре новых варианта были выявлены в гене *COL1A2*. Это один вероятно патогенный миссенс вариант: *c.758G>T, p.G253V* (PM1, PM2, PP1, PP3, PP4), унаследованный по отцовской линии и патогенный миссенс вариант *c.2450G>A, p.G817E* (PS2, PM2, PM5, PP3, PP4), возникший спонтанно. Оба варианта обусловили развитие НО, тип I. А также две протяженные делеции: экзонов 5–9 (PVS1, PS2, PM2, PP4) у пациента с НО, тип IV и экзона 50 (PVS1, PS2, PM2, PP4) у пациента с НО, тип I. В обоих случаях делеции возникли спорадически. Гиперпластические костные мозоли, характерные для пациентов с НО, тип V<sup>30</sup>, не были обнаружены у пациента с мутацией *c.306del* гена *IFITM5*, приводящей к сдвигу рамки считывания *p.L103Wfs\*3* (PVS1, PM2, PP1, PP4), не описанной ранее. По всей видимости, обнаруженная нами делеция, обусловившая фенотип ребенка, отличный от фенотипа детей с НО, тип V, описанного другими учеными, связан с тем, что именно мутация *c.-14C>T* может являться причиной развития гиперпластических мозолей. Вероятно патогенный миссенс вариант *c.185G>T*, гена *SERPINF1* у ребенка с НО, тип VI, приводящий к замене аминокислотных остатков *p.G62V* (PM2, PM5, PP3, PP4, PP5) и патогенная вставка двух нуклеотидов *c.992\_993insCA*, вызывающая сдвиг рамки считывания *p.E331Dfs\*3* (PVS1, PM2, PP4, PP5), также не были описаны в базе HGMD. Дети с мутациями генов *IFITM1* и *SERPINF1* являются первыми описаниями НО, тип V и тип VI в РФ соответственно.

Благодаря проведенному анализу полученных данных, впервые были выявлены частоты различных типов НО у российских детей (рисунок 3), определены возрастные, географические и клинические особенности развития НО, а также описаны генотип-фенотипические корреляции обладания определенными мутациями изученных таргетных областей генома с возрастом манифестации, типом и тяжестью течения НО.

<sup>30</sup> Cho T.-J., et al. A single recurrent mutation in the 5'-UTR of IFITM5 causes osteogenesis imperfecta type V // Am. J. Hum. Genet. 2012. Vol. 91, no. 2. Pp. 343–348.

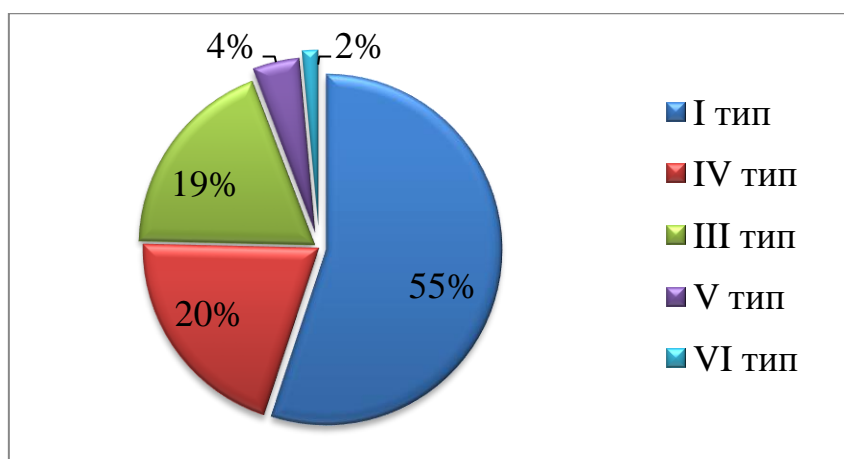


Рисунок 3 – Относительные частоты различных типов НО у обследованных российских детей

В частности, у детей, имеющих в своем геноме миссенс мутации центральных доменов генов *COL1A1* и *COL1A2*, приводящих к заменам остатка глицина, на другой аминокислотный остаток, риск манифестации НО с рождения достоверно ( $p=0,003$ ) выше  $ОШ=6,1$  (ДИ 1.7–24.0), как и риск развития тяжелого поражения костной системы («+++») достоверно ( $p=0,002$ ) выше  $ОШ=6,7$  (ДИ 1.8–28.5) по сравнению с детьми, обладающими любыми другими мутациями этих генов (таблица 14). Наряду с этим, была выявлена ассоциация «количественных» мутаций гена *COL1A1* с НО, тип I ( $p=0,001$ ), то есть, наше исследование продемонстрировало, что НО, тип I достоверно чаще вызывался нонсенс и фреймшифт мутациями гена *COL1A1*, приводящими к укороченным белковым продуктам (таблица 15).

Таблица 14 – Расчет ассоциации (p-критерий Фишера) мутаций остатков глицина, расположенных в центральных доменах генов *COL1A1* и *COL1A2*, с возрастом манифестации и с тяжестью поражения костной системы у российских детей с НО

Мутация остатков глицина	Число пациентов с манифестацией НО		p	Число детей с поражением костной системы		p
	с рождения	в другом возрасте		тяжелым («+++»)	мягким («+») и средним («++»)	
Есть	15	12	0,003	13	14	0,002
Нет	6	30		5	37	

Таблица 15 – Расчет ассоциации мутаций гена *COL1A1*, укорачивающих экспрессируемый белок, с типом НО у российских детей

Мутация нонсенс/фреймшифт	Число пациентов с НО		p-значение (критерий Фишера)	p-значение (поправка Бонферрони)
	тип I	тип III и IV		
Есть	16	1	<0,001	0,001
Нет	12	17		

При этом шансы развития НО, тип I у пациентов, обладающих такими мутациями, более чем в семь раз превышали шансы развития НО, тип III и IV ОШ=7,2 (ДИ 2,3–22,8).

**Изучение молекулярных основ нефротического синдрома у российских пациентов.** Гломерулярные заболевания являются наиболее распространенной причиной протеинурии и ХБП, приводя к тХПН, требующей диализа или трансплантации почек. НС диагностируется наличием триады симптомов: протеинурии, гипоальбуминемии и отеков, при этом в случае отсутствия одного из симптомов НС считается неполным. На сегодняшний день мутации более 50 генов были идентифицированы как причинные факторы болезней, объединенных симптомокомплексом НС у детей, демонстрируя этиологическое воздействие генетических дефектов на дифференцировку и функционирование подоцитов.

С целью выявления генетических причин развития симптомокомплекса НС, резистентного к гормональной терапии (СРНС), среди российских пациентов, а также описания частоты и спектра выявленных мутаций, нами была разработана таргетная панель, включающая кодирующие и прилегающие интронные области 57 генов: *ACTN4*, *ALG1*, *ANLN*, *APOL1*, *ARHGAP24*, *ARHGDI1*, *CASP10*, *CD151*, *CD2AP*, *CFH*, *CLCN5*, *COQ2*, *COQ6*, *COQ8B*, *COL4A3*, *COL4A4*, *COL4A5*, *CRB2*, *CUBN*, *DGKE*, *EMP2*, *EXT1*, *FAT1*, *FN1*, *INF2*, *ITGA3*, *ITGB4*, *GATA3*, *KANK1*, *KANK2*, *KANK4*, *LMNA*, *LMX1B*, *LAMB2*, *MYH9*, *MYO1E*, *NEU1*, *NPHS1*, *NPHS2*, *NUP93*, *NUP107*, *NUP205*, *NXF5*, *OCRL*, *PAX2*, *PDSS2*, *PLCE1*, *PMM2*, *PTPRO*, *SCARB2*, *SMARCA1*, *TRPC6*, *TTC21B*, *WDR73*, *WT1*, *XPO5*, *ZMPSTE24*, мутации которых были описаны ранее у пациентов с симптомокомплексом НС.

Разработанный алгоритм позволил впервые в России провести масштабное исследование таргетных областей генома с целью выявления и описания этиологических причин развития генетически обусловленных болезней, сопровождающихся симптомокомплексом НС, у 176 детей с СРНС и обнаружить генетические причины развития клинических проявлений НС у 83 (47,2%) детей, выявив 86 нуклеотидных вариантов в 24 изученных генах и описав 40 вариантов, не аннотированных ранее в международной базе данных HGMD: 22 патогенных, 10 вероятно патогенных и восемь вариантов с неизвестной патогенностью. Среди новых патогенных вариантов три варианта были выявлены в гене *NPHS1*: *c.1316-1G>A* (PVS1, PM2, PP4); *c.3286+1\_3286+6del* (PVS1, PM2, PP4); *c.3548dup, p.Y1183\** (PVS1, PM2, PP4); четыре варианта в гене *CLCN5*: *c.275G>A, p.Trp92\** (PVS1, PM2, PP4); *c.384G>A, p.W128\** (PVS1, PM2, PP4) *c.469G>T, p.E157\** (PVS1, PM2, PP4); *c.1574\_1575del, p.F525Yfs\*3* (PVS1, PM2, PP4); три варианта в гене *NUP93*: *c.880C>T, p.R294\** (PVS1, PM2, PP4); *c.1782+1G>A* (PVS1, PM2, PP4); *c.2137-1G>C* (PVS1, PM2, PP4); по два варианта в генах *NPHS2*: *c.275G>C, p.G92A* (PVS1, PM2, PM3); *c.579C>A, p.C193\** (PVS1, PM2, PM3); *COL4A3*: *c.324+2T>A* (PVS1, PM2, PP4); *c.284dup, p.S96Kfs\*34* (PVS1, PM2, PP4) и *WT1*: *c.1217G>A* (PS2, PM2, PP3, PP4); *c.1311T>G, p.F437L* (PS1, PM1, PM2, PP3, PP4); по одному варианту в генах *COL4A5*: *c.936+2T>A* (PVS1, PM2, PP4); *COQ2*: *c.571-1G>A* (PVS1, PM2, PP4); *INF2*: *c.327\_344del, p.M109\_G114del* (PS2, PM2, PM4,



PP4); *LAMB2*: c.1890G>A, p.Q630Q (PVS1, PM2, PP4); *ITGA3*: c.2281C>T, p.Q761\* (PVS1, PM2, PP4) и *OCRL*: c.479\_482dup, p.A162Ffs\*27 (PVS1, PM2, PP4).

Благодаря анализу полученных данных впервые удалось описать частоты различных типов генетически обусловленных болезней, сопровождающихся симптомокомплексом НС среди российских детей (рисунок 4).

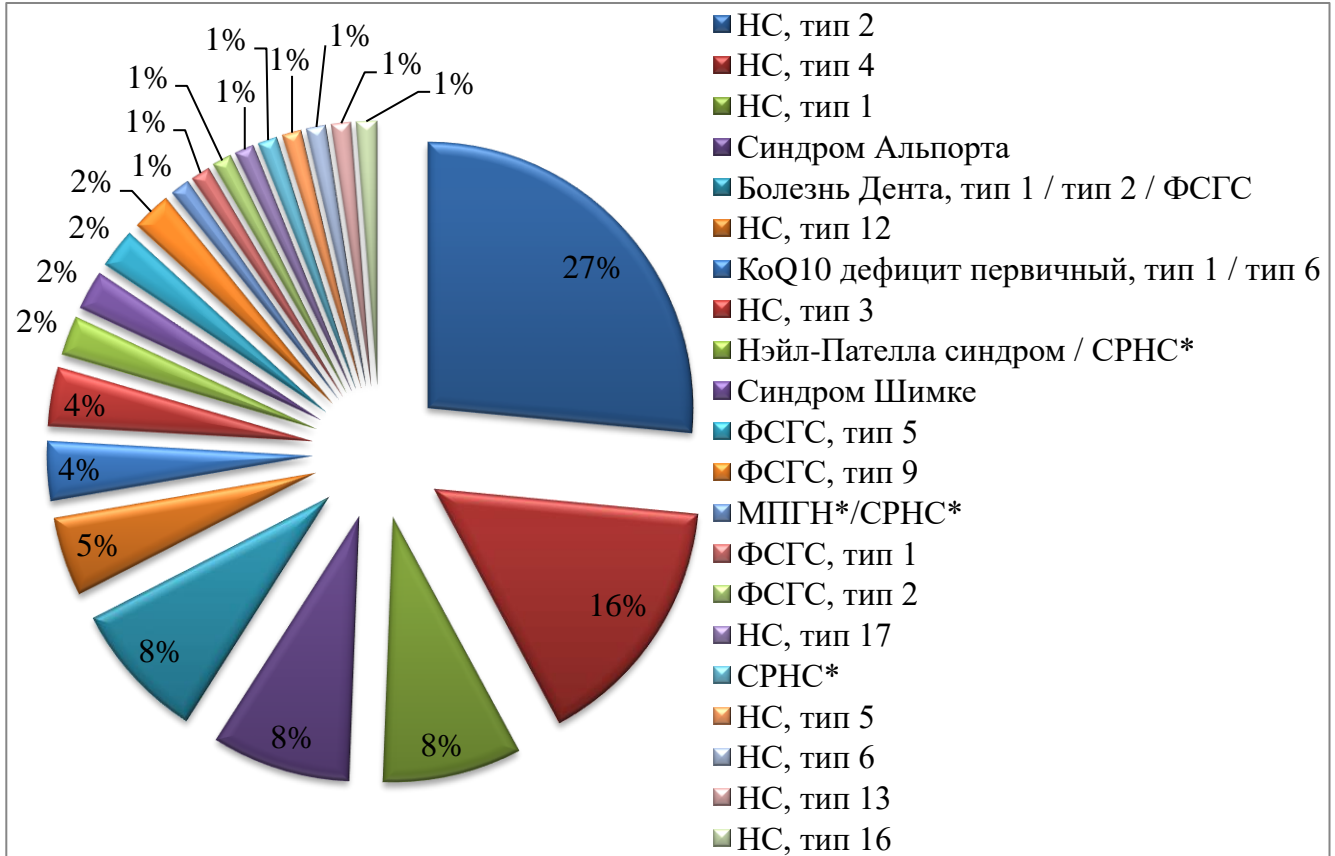


Рисунок 4 – Относительные частоты различных типов генетически обусловленных болезней почек, проявляющихся симптомокомплексом НС, у обследованных российских детей (\* – по данным базы HGMD)

Кроме того, удалось определить возрастные и географические особенности развития НС, выявив достоверное преимущественное распределение мутации *p.E87\** гена *NPHS2* среди жителей Приволжского федерального округа и юга Уральского федерального округа по сравнению с пациентами из других федеральных округов  $p < 0,001$ , ОШ=35,2 (ДИ 6,1–384,0) (таблица 16).

Вместе с тем нам удалось продемонстрировать, что в пределах одного гена определенные мутации могут быть ассоциированы с определенным возрастом дебюта НС. Например, мутация *p.E87\** гена *NPHS2* ассоциирована ( $p=0,001$ ) с манифестацией болезни до трехмесячного возраста ОШ=8,6 (ДИ 2,0–45,3), тогда как редкий полиморфизм *p.R229Q* в компаунд гетерозиготном состоянии с другими мутациями встречается у детей с медленно прогрессирующим СРНС с манифестацией в более позднем возрасте. При этом необходимо отметить, что дети с НС, обладающие мутациями, приводящими к преждевременной терминации трансляции, а также мутациями, нарушающими канонические сайты сплайсинга, обладают повышенным риском раннего дебюта болезни ОШ=3,1 (ДИ

1,2–8,4) по сравнению с детьми, обладающими любыми другими мутациями изученных генов ( $p=0,012$ ) (таблица 17).

Таблица 16 – Расчет ассоциации патогенного варианта *p.E87\** гена *NPHS2* с географическими особенностями НС у российских пациентов

Федеральный округ	Вариант <i>p.E87*</i> гена <i>NPHS2</i>		р-значение (критерий Фишера)
	есть	нет	
Приволжский, юг Уральского	10	8	<0,001
Другие	2	60	

Таблица 17 – Расчет ассоциации «количественных» мутаций, вызывающих НС, с возрастом дебюта болезни у российских детей

Возраст манифестации	«Количественные» мутации		р-значение (критерий Фишера)
	есть	нет	
≤ 6 месяцев	25	15	0,012
> 6 месяцев	15	28	

Изучение возрастных особенностей НС у обследованных пациентов позволило установить снижение доли детей с выявленными мутациями с увеличением возраста дебюта протеинурии, а результаты нефробиопсии указали на преимущественную встречаемость ФСГС среди пациентов с мутациями, а также на связь ДМС с ранним дебютом и быстрым прогрессированием болезни до терминальной стадии ХПН (тХПН). Наличие нуклеотидных вариантов генома, явившихся причиной развития генетически обусловленного НС у обследованных российских детей, коррелирует с ранней манифестацией болезни ( $p<0,001$ ), гистологической картиной ФСГС ( $p<0,001$ ), ОШ=5,4 (ДИ 2,4–12,9) и тХПН ( $p=0,007$ ), ОШ=11,1 (ДИ 1,5–494,5), являясь неблагоприятным прогностическим фактором. Кроме того, пациенты с генетически верифицированными диагнозами имеют значительно более низкий риск рецидива заболевания после трансплантации<sup>31</sup>, что позволяет сделать выбор для них в пользу трансплантации с обязательной генодиагностикой предполагаемых доноров.

Проведенные исследования позволили предложить оптимизацию молекулярной диагностики НС, начиная с секвенирования по Сэнгеру всех кодирующих и прилегающих интронных областей гена *NPHS2*, а также экзонов 8 и 9 гена *WT1* с последующим исследованием таргетных областей 57 изученных нами генов методом ШП, в случае невыявления биаллельных мутаций в таргетных областях генов *NPHS2* и *WT1*.

Выявление генетических причин развития наследственных болезней почек, проявляемых стойкой протеинурией, способствует прояснению патогенных путей развития болезни в каждом конкретном случае, помогая в выборе существующей терапии и способствуя разработке новых персонифицированных препаратов.

<sup>31</sup> Bierzyńska A., et al. Genomic and clinical profiling of a national nephrotic syndrome cohort advocates a precision medicine approach to disease management // *Kidney Int.* 2017. Vol. 91, no. 4. Pp. 937–947.

Проведенная научная работа позволяет рекомендовать молекулярно-генетическое обследование всем российским детям с СРНС, манифестировавшим в первый год жизни, так как моногенная причина развития НС была выявлена нами у 93,1% детей с врожденным НС и у 62,5% детей с НС, дебютировавшим в возрасте от 4 до 12 месяцев. Генетическое тестирование для детей с СЧНС в настоящее время не рекомендуется, что было подтверждено на примере пяти обследованных детей с дебютом болезни до 6 месяцев, отвечающих на терапию стероидами и не имеющих мутаций ни в одном из исследованных генов. Вместе с тем молекулярно-генетическое исследование необходимо рекомендовать проводить детям с семейной историей НС или прогрессирующей болезнью почек.

**Изучение молекулярных основ кардиомиопатий у российских пациентов.** В 2016 году нами был разработан метод диагностики генетически обусловленных КМП, считающихся редкими болезнями в педиатрической когорте пациентов<sup>32</sup>. Очевидно, что эти преимущественно аутосомно-доминантные болезни обладают значительной генетической и фенотипической гетерогенностью, нередко имея скрытое течение, поэтому клиническая значимость их молекулярной диагностики особенно подчеркивается Американской коллегией медицинской генетики и геномики, придающей ряду генов, мутации которых отвечают за развитие КМП, особый статус, требующий обязательного анализа во всех случаях секвенирования экзома и генома<sup>33</sup>.

В кардиологическую панель были включены кодирующие и прилегающие интронные области 75 генов, мутации которых вовлечены в развитие синдромальных состояний, нервно-мышечных заболеваний, наследственных болезней обмена, митохондриальных расстройств, а также мутации в генах, кодирующих структурные компоненты кардиомиоцитов, вызывая клинические проявления КМП: *ABCC9, ACTC1, ACTN2, ALMS1, ANKRD1, BAG3, CACNA1C, CAV3, CRYAB, CSRP3, CTNNA3, DES, DMD, DSC2, DSG2, DSP, DTNA, EMD, EYA4, FH1, FKRP, FKTN, GATAD1, ILK, JPH2, JUP, KRAS, LAMA2, LAMA4, LAMP2, LDB3, LMNA, LZTR1, MIB1, MYBPC3, MYH6, MYH7, MYL2, MYL3, MYLK, MYLK2, MYOZ2, MYPN, NEBL, NEXN, PKP2, PLN, PRKAG2, PSEN1, PSEN2, PTPN11, RAF1, RBM20, RYR2, RIT1, SCN5A, SOS1, SOS2, SDHA, SGCD, SYNE2, TAZ, TBX20, TCAP, TGFB3, TMEM43, TMEM70, TMPO, TNNC1, TNNI3, TNNT2, TPM1, TTN, TXNRD2, VCL*.

Разработанный алгоритм молекулярной диагностики КМП позволил впервые в России провести масштабное исследование таргетных областей генома с целью выявления и описания этиологических причин развития КМП у 199 детей с подозрением на генетическую природу болезни и обнаружить посредством методов СНП и ХММА этиологические причины развития КМП у 181 ребенка, выявив 173 различных нуклеотидных варианта в 39 изученных генах, а также протяженную делецию хромосомной области 1p36, и описав 80 новых

<sup>32</sup> *Lipshultz S.E., et al.* The incidence of pediatric cardiomyopathy in two regions of the United States // *N. Engl. J. Med.* 2003. Vol. 348, no. 17. Pp. 1647–1655.

<sup>33</sup> *Green R.C., et al.* American College of Medical Genetics and Genomics. ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing // *Genet. Med.* 2013. Vol. 15, no. 7. Pp. 565–574.

нуклеотидных вариантов, не аннотированных ранее в международной базе данных HGMD, из которых 28 вариантов – патогенные, 32 варианта – вероятно патогенные и 20 вариантов – с неизвестной патогенностью. Среди 28 патогенных вариантов, не описанных ранее, четыре варианта были обнаружены в гене *TTN*: *c.13696C>T, p.Q4566\** (PVS1, PM2, PP4); *c.105048C>A, p.C35016\** (PVS1, PM2, PP4); *c.87040dup, p.R29014Pfs\*5* (PVS1, PM2, PP4); *c.71028\_71029delinsC, p.Q23676Hfs\*16* (PVS1, PM2, PP4); по три варианта были обнаружены в генах *MYH7*: *c.3706G>T, p.E1236\** (PVS1, PM2, PP4); *c.727C>A, p.R243S* (PS2, PM2, PM5, PP3, PP4); *c.2512C>T, p.P838S* (PS2, PM2, PM5, PP3, PP4); *MYBPC3*: *c.1505G>C, p.R502Q* (PS1, PM1, PM2, PM5, PP3, PP4); *c.1855G>T, p.E619\** (PVS1, PM2, PP4); *c.2906-2A>C* (PVS1, PM2, PP4); по два варианта в генах *DSP*: *c.4354A>T, p.R1452\** (PVS1, PM2, PP4); *c.5004dup, p.L1669Tfs\*15* (PVS1, PM2, PP4); *LAMP2*: *c.733C>T, p.Q245\** (PVS1, PM2, PP4); *c.893\_923del, p.E298Afs\*38* (PVS1, PM2, PP4); *NEXN*: *c.799G>T, p.E267\** (PVS1, PM2, PP4); *c.1867C>T, p.Q623\** (PVS1, PM2, PP4); *TPM1*: *c.4G>A, p.D2N* (PS2, PM1, PM2, PP3, PP4); *c.76G>A, p.E26K* (PS2, PM2, PM5, PP3, PP4); по одному варианту в генах *MYH6*: *c.1875C>A, p.Y625\** (PVS1, PM2, PP4); *RAF1*: *c.741\_776del, p.E248\_S259del* (PS2, PM1, PM2, PM4, PP4); *ALMS1*: *c.1063C>T, p.Q355\** (PVS1, PM2, PP4); *FHL1*: *c.4del, p.A2Rfs\*28* (PVS1, PM2, PP4); *MIB1*: *c.461del, p.G154Vfs\*25* (PVS1, PM2, PP4); *MYL3*: *c.559+1G>A* (PVS1, PM2, PP4); *PRKAG2*: *c.1585-1G>A* (PVS1, PM2, PP4); *SOS1*: *c.940\_943del, p.Q314Yfs\*13* (PVS1, PM2, PP4); *TAZ*: *c.208del, p.E70Sfs\*31* (PVS1, PM2, PP4); *VCL*: *c.1713del, p.A573Hfs\*8* (PVS1, PM2, PP4).

Благодаря анализу полученных данных впервые удалось описать частоты различных типов генетически обусловленных КМП среди российских детей (рисунок 5), определить возрастные и географические особенности развития КМП.

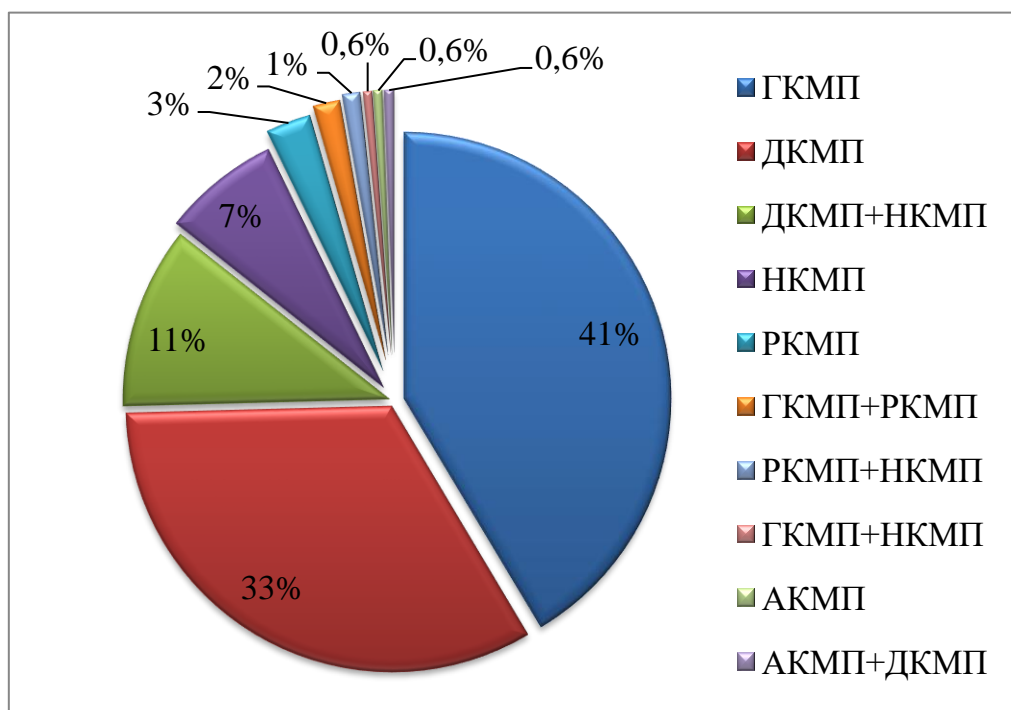


Рисунок 5 – Доли различных типов генетически обусловленных КМП у обследованных российских детей

Выявленные генотип-фенотипические корреляции указывают на повышенный риск дебюта первичной КМП в возрасте до 3 месяцев у детей, обладающих мутациями, преждевременно прерывающими синтез кодируемых белков и мутациями, затрагивающими канонические сайты сплайсинга (ОШ=2,8 (ДИ 1,2–7,0)) (таблица 18).

Таблица 18 – Расчет ассоциации типа мутаций с возрастом манифестации первичной КМП у российских детей

Возраст манифестации	Мутации		р-значение (критерий Фишера)
	«количественные»	другие	
≤ 3 месяцев	19	43	0,014
> 3 месяцев	12	77	

В большинстве случаев ранняя манифестация КМП обуславливает тяжелую клиническую картину болезни, что в полной мере соответствует действительности для пациентов с гомозиготными и компаунд гетерозиготными мутациями генов *MYBPC3*, *MYL3* и *NEXN*. Тяжесть фенотипа 15 детей с рецессивными мутациями этих генов подтверждалась высокими концентрациями мозгового натрийуретического пептида NT-proBNP, а также низкой фракцией выброса из левого желудочка, что согласуется с данными зарубежных публикаций<sup>34</sup>. Вместе с тем удалось обнаружить высокодостоверные ( $p < 0,001$ ) различия в возрасте дебюта КМП у этих детей по сравнению с группой пациентов с доминантными мутациями любых изученных генов, явившихся причиной развития КМП (таблица 19).

Таблица 19 – Расчет ассоциации типа наследования с возрастом манифестации КМП у российских детей

Возраст манифестации, мес	Мутации		р-значение (критерий Фишера)
	рецессивные	доминантные	
≤ 3 месяцев	11	30	<0,001
> 3 месяцев	4	106	

Таким образом, российские дети с КМП, развившейся вследствие рецессивных мутаций, обладают повышенным риском дебюта болезни в возрасте до 3 месяцев по сравнению с российскими детьми с КМП, вызванной доминантными вариантами: ОШ=9,5 (ДИ 2,6–44,1).

Кроме того, обнаружена достоверная ассоциация ( $p=0,003$ ), выявившая значимые предикторы статуса ГКМП у детей с мутациями гена *MYBPC3* (ОШ=5,3 (ДИ 1,8–15,9)), а также достоверные ассоциации вариантов *c.1357C>A* ( $p=0,013$ ) и *c.602T>C* ( $p=0,008$ ) гена *MYH7* с гипертрофическим и дилатационным фенотипом соответственно. Сравнивая семейные и спорадические случаи КМП, изученные в нашем исследовании, мы смогли обнаружить более высокую частоту мутаций в

<sup>34</sup> Zahka K., et al. Homozygous mutation of MYBPC3 associated with severe infantile hypertrophic cardiomyopathy at high frequency among the Amish // Heart. 2008. Vol. 94, no. 10. Pp. 1326–1330.

семейных случаях: 67,9% против 32,1%. К тому же в группе детей со спорадическими мутациями, существует высокодостоверная ассоциация ( $p < 0,001$ ) с беременностями, протекавшими с ОРВИ на ранних стадиях развития эмбриона (таблица 20), что может свидетельствовать о повышенном риске развития КМП, вызванного спонтанными мутациями, у детей, родившихся в результате таких беременностей, по сравнению с детьми с моногенными КМП, родившимися в результате беременностей протекавших физиологически, а также беременностей, протекавших с любыми другими осложнениями  $ОШ=10,6$  (ДИ 3,6–34,1).

Таблица 20 – Расчет ассоциации мутаций, возникших *de novo*, с течением беременности

Течение беременности	Мутации		р-значение (критерий Фишера)
	спонтанные	унаследованные	
с ОРВИ	20	8	<0,001
без ОРВИ	14	61	

С очевидной эффективностью, совершенствуемой точностью и снижением себестоимости исследования СНП постепенно становится стандартом исследования ДНК, при этом для внедрения такого метода диагностики в каждодневную практику необходимо использовать высокие аналитические стандарты. В данной работе нам удалось продемонстрировать высокую аналитическую точность и клиническую значимость диагностики таргетных областей 75 генов генома человека, убеждаясь, что СНП с валидацией выявленных вариантов методом секвенирования по Сэнгеру является лучшим алгоритмом клинической рутинной диагностики таких групп болезней как генетически обусловленные КМП, обосновывая продолжающийся в развитых странах переход к парадигме развития высокопроизводительного секвенирования в геномике человека, как основы молекулярной медицины ближайшего будущего.

## ВЫВОДЫ

1. Частота обнаружения изученных в настоящей работе случаев моногенных редких болезней, выявленных в результате селективного скрининга 31447 пациентов, составляет: 0,28% – для БФ, 0,94% – для БГ, 0,76% – для МПС I, 0,64% – для БП, 2,5% – для тирозинемии, тип I, 37,3% – для цистиноза, 98,6% – для НО, 91,7% – для ГБ, 47,2% – для НС, 91,0% – для КМП. Полученные данные свидетельствуют о высокой специфичности критериев отбора пациентов для селективного скрининга болезней с преимущественным поражением одной системы и их недостаточной специфичности – при отборе пациентов для ранней диагностики лизосомных болезней накопления.

2. Предложена оптимизация биохимической диагностики случаев БФ у мужчин и БГ у пациентов обоих полов, путем измерения концентрации лизо-Гб3 и лизо-Гл1 соответственно, в сухих пятнах крови методом ВЭЖХ-МС/МС, что позволило довести показатели чувствительности и специфичности обоих методов до 100%.

3. Оптимизирован метод биохимической диагностики цистиноза с помощью измерения концентрации цистина в полиморфонуклеарных лейкоцитах крови со стабилизацией осадка клеток раствором N-этилмалеимида методом ВЭЖХ-МС/МС, что позволило повысить специфичность метода до 100%.

4. Определены относительные частоты 694 вариантов нуклеотидной последовательности генома, расположенных в 82 генах, вызвавших развитие 1142 случаев редких болезней, исследованных в настоящей работе, а также изучена частота различных типов мутаций по их влиянию, оказываемому на синтезируемый белок, а также по месту локализации этих белков.

5. Описаны клинические и возрастные особенности российских пациентов, страдающих изученными редкими болезнями, а также выявлены мутации, характерные для определенных географических регионов нашей страны, а также для определенных этносов, населяющих территорию РФ. В частности, мутация *c.1025C>T* гена *FAH*, вызывающая тирозинемия, тип I, характерна для чеченского этноса, а *c.1090G>C* того же гена – для жителей Якутии и Бурятии; мутация *c.1015G>A* гена *CTNS*, вызывающая нефропатический цистиноз, характерна для карачаевской этнической группы, а *c.518A>G* того же гена – для чеченской; мутация *c.259G>T* гена *NPHS2* имеет преимущественное накопление среди детей с нефротическим синдромом, проживающих в Приволжском федеральном округе и на юге Уральского федерального округа.

6. Проведен анализ патогенности 321 нового варианта нуклеотидной последовательности генома, среди которых 212 – патогенные, 73 – вероятно патогенные, 36 – с неизвестной клинической значимостью, не аннотированных до проведения настоящего исследования в базе данных HGMD, с помощью использования российского Руководства по интерпретации данных последовательности ДНК человека, а также описаны клинические особенности наследственных заболеваний у подавляющего большинства их обладателей.

7. Оптимизирована молекулярно-генетическая диагностика БГ, МПС, тип I, БП, тирозинемии, тип I, ГБ, тип Ia, тип Ib, тип III, тип VI, тип IXc, НО, тип V, НС, тип 2, тип 4 с помощью анализа мажорных мутаций, на усредненную долю которых приходится 52,6% от суммарных долей всех выявленных вариантов генов, ответственных за развитие этих 12 редких болезней.

8. Генотип-фенотипические корреляции, выявленные у российских пациентов, геном которых содержит патогенные варианты нуклеотидной последовательности, преждевременно прерывающие синтез кодируемых белков, указывают на раннее начало и/или особую тяжесть клинической картины БФ, БГ, МПС, тип I и II, цистиноза, ГБ, тип III, НС, КМП и на мягкую форму НО, тип I, тогда как миссенс мутации центрального домена гена *COL1A1*, напротив, ассоциированы с тяжелыми формами НО, тип III и IV.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Оптимальные отрезные точки, соответствующие максимальным показателям чувствительности и специфичности, определенные в рамках данной научной работы, могут быть использованы для диагностики БФ, БГ, БП, МПС, тип I, тирозинемии, тип I и цистиноза у российских пациентов.

2. Биомаркеры лизо-Гб3 и Лизо-Гл1 рекомендуется использовать для первичной диагностики российских мужчин с подозрением на БФ и пациентов обоих полов с подозрением на БГ соответственно.

3. Для первичной диагностики цистиноза целесообразно проводить измерение концентрации цистина в полиморфноядерных лейкоцитах крови со стабилизацией осадка раствором N-этилмалеимида.

4. Российским пациентам тирозинемией, тип I, цистинозом, БФ и БГ рекомендуется осуществлять мониторинг патогенетической терапии путем измерения концентрации накапливающихся в организме веществ: сукцинилацетона, цистина, лизо-Гб3 и лизо-Гл1 соответственно.

5. Молекулярно-генетическую диагностику тирозинемии, тип I в Чеченской Республике следует начинать с выявления патогенного варианта *c.1025C>T* гена *FAH*, тогда как патогенный вариант *c.1090G>C*, *p.E364Q* в первую очередь следует типировать у жителей Бурятии и Якутии с подозрением на тирозинемии, тип I.

6. Молекулярно-генетическую диагностику цистиноза в Карачаево-Черкесской Республике следует начинать с выявления патогенного варианта *c.1015G>A*, *p.G339R* гена *CTNS*, тогда как патогенный вариант *c.518A>G*, *p.Y173C* в первую очередь следует типировать у жителей Чеченской Республики с подозрением на цистиноз.

7. Для выбора оптимальной схемы лечения российских детей с врожденным и инфантильным СРНС, рекомендуется проведение молекулярно-генетического обследования методом СМП.

8. Рекомендуется использование российского Руководства по интерпретации данных последовательности ДНК человека для описания новых вариантов генома у российских пациентов.

9. Для молекулярной диагностики БФ, БГ, БП, тирозинемии, тип I, цистиноза, НС, НО, ГБ и КМП у российских пациентов предлагается использовать разработанные и оптимизированные алгоритмы диагностики, продемонстрировавшие высокую эффективность.

## ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Планируется дальнейшая оптимизация методики анализа активности ферментов  $\alpha$ -галактозидазы А, 1,4- $\alpha$ -глюкозидазы,  $\beta$ -D-глюкоцеребозидазы, и  $\alpha$ -L-идурунидазы с помощью мультиплексирования этих аналитов с использованием набора реактивов NeoLSD™ MSMS Kit, производства компании Wallac Oy (Финляндия), что позволит экономить временные трудозатраты на постановке контрольного фермента.

2. Необходимо продолжить изучение биомаркеров лизо-Гб3 и лизо-Гл1 для определения целесообразности их использования в качестве аналитов для проведения скрининга новорожденных на БФ и БГ соответственно.

3. Планируется научная работа, посвященная длительному мониторингу концентрации лизо-Гб3 в крови российских пациентов с БФ, для определения роли антител к проводимой ФЗТ в целях ее дальнейшей коррекции.



4. Требуются исследования, направленные на поиск химических веществ, способных стабилизировать молекулы цистина в пятнах крови, высушенных на фильтровальной бумаге, либо на поиск других биомаркеров, анализ которых позволит с высокой эффективностью выявлять цистиноз в сухих пятнах крови.

5. Продолжение исследований, направленных на поиск мажорных мутаций, как в отдельных популяционных группах, так и в российской популяции в целом, а также организация популяционного типирования выявленных мажорных вариантов, позволит проводить профилактические мероприятия, способствующие уменьшению генетического груза популяций.

6. Проведенные исследования закладывают основу для создания регистров по изученным редким болезням, которые будут содержать информацию о клинических, географических, возрастных и молекулярных особенностях российских пациентов.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- БГ – болезнь Гоше
- БП – болезнь Помпе
- БФ – болезнь Фабри
- ГБ – гликогеновые болезни
- Гб3 – глоботриаозилцерамид (Gb-3)
- Гл1 – гликозилфингозин (Gl-1)
- ГКМП – гипертрофическая кардиомиопатия
- ДКМП – дилатационная кардиомиопатия
- КМП – кардиомиопатия
- МГНЦ – Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова, федеральное государственное бюджетное научное учреждение (ФГБНУ «МГНЦ»)
- ДМС – диффузный мезангиальный склероз
- ЛБН – лизосомные болезни накопления
- МППН – мембранопролиферативный гломерулонефрит
- МПС – мукополисахаридоз
- МС/МС – тандемная масс-спектрометрия
- ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией
- НКМП – некомпактная кардиомиопатия
- НО – несовершенный остеогенез
- НС – нефротический синдром
- НСМИ – нефротический синдром с минимальными изменениями
- ОРВИ – острая респираторная вирусная инфекция
- ОШ (OR) – отношение шансов (*от англ.* Odds Ratio)
- ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- РКМП – рестриктивная кардиомиопатия
- СНП (NGS) – секвенирование нового поколения (*от англ.* Next Generation Sequencing)
- СРНС – стероидрезистентный нефротический синдром
- СРТ – субстрат-редуцирующая терапия
- СЧНС – стероидчувствительный нефротический синдром

ТМС – тандемная масс-спектрометрия

ФЗТ – ферментозаместительная терапия

ФСГС – фокальный сегментарный гломерулосклероз

ХБП – хроническая болезнь почек

ХММА – хромосомный микроматричный анализ

ХПН – хроническая почечная недостаточность

тХПН – терминальная стадия хронической почечной недостаточности

CDC – Центр по контролю и профилактике заболеваний (*от англ.* Centers for Disease Control and Prevention)

FWHM – полная ширина на уровне половинной амплитуды (*от англ.* Full Width at Half Maximum)

HGMD – база данных мутаций в генах человека, которые вызывают наследственные заболевания или связаны с ними (*от англ.* Human Gene Mutation Database)

MLPA – мультиплексная лигазозависимая амплификация проб (*от англ.* Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification)

ОМИМ – медицинская база данных «Менделевское наследование у человека» (*от англ.* Online Mendelian Inheritance in Man)

## ПЕРЕЧЕНЬ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### *Научные статьи, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ*

1. Баранов, А.А. Ведение детей с болезнью Гоше. Современные клинические рекомендации / А.А. Баранов, Л.С. Намазова-Баранова, О.С. Гундобина, Е.А. Лукина, А.К. Геворкян, К.В. Савостьянов, А.А. Пушков, Е.А. Вишнёва, Г.Б. Мовсисян // Педиатрическая фармакология. – 2016. – Т. 13, № 3. – С. 244–250. DOI: 10.15690/pf.v13i3.1574

2. Журкова, Н.В. Недостаточность комплекса V дыхательной цепи митохондрий, тип 2 (АТФ-синтазы), обусловленная мутациями в гене *TMEM70*: первое в России клиническое описание / Н.В. Журкова, Н.Д. Вашакмадзе, К.В. Савостьянов, А.А. Пушков, А.Н. Нестеров, Л.С. Намазова-Баранова // Педиатрическая фармакология. – 2018. – Т. 15, № 2. – С. 175–178. DOI: 10.15690/pf.v15i2.1874

3. Игнатович, О.Н. VI тип несовершенного остеогенеза. Наблюдение редкого случая / О.Н. Игнатович, Л.С. Намазова-Баранова, Т.В. Маргиева, Н.В. Журкова, К.В. Савостьянов, А.А. Пушков // Педиатрическая фармакология. – 2019. – Т. 16, № 1. – С. 30–35. DOI: 10.15690/pf.v16i1.2001

4. Игнатович, О.Н. Несовершенный остеогенез: особенности диагностики / О.Н. Игнатович, Л.С. Намазова-Баранова, Т.В. Маргиева, Г.Т. Яхяева, Н.В. Журкова, К.В. Савостьянов, А.А. Пушков, И.А. Кротов // Педиатрическая фармакология. – 2018. – Т. 15, № 3. – С. 224–232. DOI: 10.15690/pf.v15i3.1902

5. Костюшина, И.С. Случай нетяжелого течения врожденного нефротического синдрома / И.С. Костюшина, Т.В. Маргиева, Т.Н. Гусарова, Г.Т. Яхяева, Л.С. Намазова-Баранова, А.А. Пушков, К.В. Савостьянов // Педиатрическая фармакология. – 2014. – Т. 11, № 6. – С. 62–65. DOI: 10.15690/pf.v11i6.1217

6. Кузенкова, Л.М. Болезнь Фабри: особенности заболевания у детей и подростков / Л.М. Кузенкова, Л.С. Намазова-Баранова, Т.В. Подклетнова, А.К. Геворкян, Н.Д. Вашакмадзе, К.В. Савостьянов, В.М. Студеникин, А.А. Пушков // Вопросы современной педиатрии. – 2015. – Т. 14, № 3. – С. 341–348. DOI: 10.15690/vsp.v14i3.1369

7. Кузенкова, Л.М. Неврологические симптомы болезни Фабри у детей и подростков / Л.М. Кузенкова, В.М. Студеникин, А.К. Геворкян, Т.В. Подклетнова, Н.Д. Вашакмадзе, К.В. Савостьянов // Эффективная фармакотерапия. – 2013. – № 30. – С. 50–61.

8. Мазанова, Н.Н. Биохимическая и молекулярно-генетическая диагностика тирозинемии I типа у российских больных / Н.Н. Мазанова, К.В. Савостьянов, Л.С. Намазова-Баранова, А.А. Баранов, А.А. Пушков, Л.В. Муравьева, А.В. Сухоженко // Российский педиатрический журнал. – 2017. – Т. 20, № 2. – С. 68–73.

9. Мовсисян, Г.Б. Болезнь Гоше в РФ – педиатрический опыт / Г.Б. Мовсисян, Л.С. Намазова-Баранова, К.В. Савостьянов, О.С. Гундобина // Вопросы современной педиатрии. – 2016. – Т. 15, № S1. – С. 192–195.

10. Мовсисян, Г.Б. Демографическая и клинико-генетическая характеристика детей с болезнью Гоше в Российской Федерации: Данные педиатрического регистра / Г.Б. Мовсисян, О.С. Гундобина, Л.С. Намазова-Баранова, К.В. Савостьянов, А.А. Пушков, В.В. Черников, Н.Н. Мазанова, А.М. Романюк, В.И. Смирнов // Педиатрическая фармакология. – 2016. – Т. 13, № 4. – С. 354–361. DOI: 10.15690/pf.v13i4.1607

11. Мовсисян, Г.Б. Особенности диагностики болезни Гоше у детей в Российской Федерации / Г.Б. Мовсисян, А.Н. Сурков, Л.С. Намазова-Баранова, К.В. Савостьянов // Российский журнал детской гематологии и онкологии. – 2020. – Т. 7, № 2. – С. 42–53. DOI: 10.21682/2311-1267-2020-7-2-42-53

12. Мовсисян, Г.Б. Российский педиатрический опыт по оценке эффективности применения имиглюцеразы для долгосрочной ферментной заместительной терапии болезни Гоше 1-го типа у детей / Г.Б. Мовсисян, Л.С. Намазова-Баранова, К.В. Савостьянов, О.С. Гундобина, Е.Л. Семикина, М.В. Рязанов, М.Л. Травина, В.В. Черников, А.А. Пушков, Т.М. Букина // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2017. – Т. 72, № 5. – С. 383–392. DOI: 10.15690/vramn792

13. Моисеев, С.В. Болезнь Фабри у пациентов, получающих лечение программным гемодиализом / С.В. Моисеев, Л.С. Намазова-Баранова, К.В. Савостьянов, А.С. Моисеев, В.В. Фомин // Нефрология и диализ. – 2017. – Т. 19, № 3. – С. 382–388. DOI: 10.28996/1680-4422-2017-3-382-388

14. Моисеев, С.В. Распространенность и клинические проявления болезни Фабри у диализных пациентов / С.В. Моисеев, Л.С. Намазова-Баранова, К.В. Савостьянов, А.С. Моисеев, В.В. Фомин // Клиническая фармакология и терапия. – 2017. – Т. 26, № 2. – С. 27–33.

15. Пушков, А.А. Краткие рекомендации по подготовке рукописей, содержащих информацию о результатах молекулярно-генетических исследований / А.А. Пушков, К.В. Савостьянов, А.Г. Никитин // Вопросы современной педиатрии. – 2018. – Т. 17, № 5. – С. 364–366. DOI: 10.15690/vsp.v17i5.1951

16. Рыжкова, О.П. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2) / О.П. Рыжкова, О.Л. Кардымон, Е.Б. Прохорчук, Ф.А. Коновалов, А.Б. Масленников, В.А. Степанов, А.А. Афанасьев, Е.В. Заклязьминская, Д.В. Ребриков, К.В. Савостьянов, А.С. Глотов, А.А. Костарева, А.Е. Павлов, М.В. Голубенко, А.В. Поляков, С.И. Куцев // Медицинская генетика. – 2019. Т. 18, № 2. – С. 3–23. DOI: 10.25557/2073-7998.2019.02.3-23

17. Савостьянов, К.В. Клиническое применение массивного параллельного секвенирования в молекулярной диагностике наследственных болезней накопления гликогена среди детского населения России / К.В. Савостьянов, А.Н. Сурков, Л.С. Намазова-Баранова, И.С. Жанин, А.А. Пушков, Е.Н. Басаргина, А.Г. Никитин, А.С. Потапов, А.В. Пахомов, А.А. Баранов // Российский педиатрический журнал. – 2017. – Т. 20, № 3. – С. 132–139.

18. Савостьянов, К.В. Лабораторные исследования и болезнь Помпе: От подозрения до мониторинга терапии / К.В. Савостьянов, С.С. Никитин, К.Е. Карпачёва // Нервно-мышечные болезни. – 2016. – Т. 6, № 1. – С. 54–62. DOI: 10.17650/2222-8721-2016-6-1-54-62.

19. Савостьянов, К.В. Новые варианты генома российских детей с генетически обусловленными кардиомиопатиями, выявленные методом массового параллельного секвенирования / К.В. Савостьянов, Л.С. Намазова-Баранова, Е.Н. Басаргина, Н.Д. Вашакмадзе,

Н.В. Журкова, А.А. Пушков, И.С. Жанин, Н.А. Сдвигова, В.Ю. Луканина, А.Г. Никитин // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2017. – Т. 72, № 4. – С. 242–253. DOI: 10.15690/vramn872

20. Савостьянов, К.В. Хромато-масс-спектрометрическая и молекулярно-генетическая диагностика цистиноза у российских детей / К.В. Савостьянов, Н.Н. Мазанова, А.А. Пушков, П.В. Ананьин, А.В. Сухоженко, П.В. Смирнов, Н.А. Маянский, А.Н. Цыгин, Л.С. Намазова-Баранова // Педиатрия. Журнал имени Г.Н. Сперанского. – 2018. – Т. 97, № 5. – С. 71–78.

21. Сдвигова, Н.А. Актуальность генетической верификации некомпактной кардиомиопатии у детей: клинические случаи / Н.А. Сдвигова, Е.Н. Басаргина, Д.В. Рябцев, К.В. Савостьянов, А.А. Пушков, Н.В. Журкова, Г.В. Ревуненков, О.П. Жарова // Вопросы современной педиатрии. – 2018. – Т. 17, № 2. – С. 157–165. DOI: 10.15690/vsp.v17i2.1883

22. Сладков, Д.Г. Новый метод молекулярно-генетической диагностики стероидрезистентного нефротического синдрома / Д.Г. Сладков, К.В. Савостьянов, А.Н. Цыгин, А.А. Пушков, И.С. Жанин, А.Г. Никитин, А.В. Пахомов, П.В. Ананьин // Медицинская генетика. – 2016. – Т. 15, № 5(167). – С. 38–41. DOI: 10.1234/XXXX-XXXX-2016-5-38-41

23. Сурков, А.Н. Две новые мутации в гене *SLC37A4* у ребенка с гликогеновой болезнью IV типа / А.Н. Сурков, А.А. Баранов, Л.С. Намазова-Баранова, К.В. Савостьянов, А.А. Пушков, Н.В. Журкова, О.В. Кустова, А.С. Потапов, Г.Б. Мовсисян, А.К. Геворкян, Г.В. Волынец, Т.А. Скворцова // Молекулярная медицина. – 2017. – Т. 15, № 1. – С. 40–44.

24. Сурков, А.Н. Динамика клинколабораторных показателей у детей с гликогеновой болезнью I типа на фоне комплексной терапии / А.Н. Сурков, А.А. Баранов, Л.С. Намазова-Баранова, А.С. Карулина, А.С. Потапов, Н.Н. Семенова, О.С. Гундобина, А.К. Геворкян, К.В. Савостьянов, А.А. Пушков, Н.В. Журкова, Г.В. Волынец, М.М. Шилова // Российский педиатрический журнал. – 2016. – Т. 19, № 6. – С. 324–331.

25. Сурков, А.Н. Случай множественных аденом печени у подростка с тяжелым течением гликогеновой болезни типа IV / А.Н. Сурков, Л.С. Намазова-Баранова, А.С. Потапов, К.В. Савостьянов, А.А. Пушков, А.Г. Никитин, С.И. Полякова, М.В. Рязанов, О.В. Кустова, В.И. Барский, М.Ю. Степанян // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2014. – Т. 69, № 11–12. – С. 54–59. DOI: 10.15690/vramn.v69i11-12.1183

26. Яхяева, Г.Т. V тип несовершенного остеогенеза. Наблюдение редкого случая / Г.Т. Яхяева, Т.В. Маргиева, Л.С. Намазова-Баранова, К.В. Савостьянов, А.А. Пушков, Н.В. Журкова, К.В. Жердев, Н.Д. Вашакмадзе, А.К. Геворкян // Педиатрическая фармакология. – 2015. – Т. 12, № 1. – С. 79–84. DOI: 10.15690/pf.v12i1.1251

27. Яхяева, Г.Т. Молекулярно-генетические основы наследственных заболеваний соединительной ткани, сопровождающихся частыми переломами / Г.Т. Яхяева, Л.С. Намазова-Баранова, Т.В. Маргиева, Н.В. Журкова, А.А. Пушков, К.В. Савостьянов // Вопросы современной педиатрии. – 2016. – Т. 15, № 2. – С. 175–179. DOI: 10.15690/vsp.v15i2.1536

### Другие статьи

28. Журкова, Н.В. Некоторые аспекты дифференциальной диагностики мукополисахаридозов / Н.В. Журкова, Н.Д. Вашакмадзе, О.Б. Кондакова, К.В. Савостьянов // Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. Вып. 28. / Под ред. чл.-корр. РАЕН А.Б. Масленникова. – Новосибирск: Академиздат, 2018. – С. 158–171.

29. Полякова, С.И. Наследственная тирозинемия 1-го типа: Что нужно знать педиатрам / С.И. Полякова, К.В. Савостьянов, А.А. Пушков // Практика педиатра. – 2014. – № 1. – С. 4–16.

30. Chistiakov, D.A. Genetic Analysis of 17 Children with Hunter Syndrome: Identification and Functional Characterization of Four Novel Mutations in the Iduronate-2-Sulfatase Gene / D.A. Chistiakov, L.M. Kuzenkova, K.V. Savost'yanov, A.K. Gevorkyan, A.A. Pushkov, A.G. Nikitin, N.D. Vashakmadze, N.V. Zhurkova, T.V. Podkletnova, L.S. Namazova-Baranova, A.A. Baranov // Journal of Genetics and Genomics. – 2014. – Vol. 41, no. 4. – Pp. 197–203.

31. Chistiakov, D.A. Molecular Characteristics of Patients with Glycosaminoglycan Storage Disorders in Russia / D.A. Chistiakov, K.V. Savost'yanov, A.A. Pushkov, A.G. Nikitin, A.V. Pakhomov, N.V. Zhurkova, L.M. Kuzenkova, N.D. Vashakmadze, T.V. Podkletnova, A.K. Gevorkyan,

L.S. Namazova-Baranova, N.A. Mayansky, A.A. Baranov // *Clinica Chimica Acta*. – 2014. – Vol. 436. Pp. 112–120. DOI: 10.1016/j.cca.2014.05.010

32. Moiseev, S. The Prevalence and Clinical Features of Fabry Disease in Hemodialysis Patients: Russian Nationwide Fabry Dialysis Screening Program / S. Moiseev, V. Fomin, K. Savostyanov, A. Pushkov, A. Moiseev, A. Svistunov, L. Namazova-Baranova // *Nephron*. – 2019. – Vol. 141, no. 4. – Pp. 249–255. – DOI: 10.1159/000495886

33. Namazova-Baranova, L.S. Fabry Disease in Children: A Federal Screening Programme in Russia / L.S. Namazova-Baranova, A.A. Baranov, A.A. Pushkov, K.V. Savostyanov // *European Journal of Pediatrics*. – 2017. – Vol. 176, no. 10. – Pp. 1385–1391.

34. Namasova-Baranova, L. The Results of NTBC Treatment of Hereditary Tyrosinemia Type 1 Patienties in Russia – the Improvement of Liver Fibroses Stage, Rickets and Bone Density / L. Namasova-Baranova, S. Polyakova, N. Komarova, G. Baydakova, K. Jerdev, M. Varichkina, K. Savostyanov, A. Pushkov, T. Chetkina, N. Evlukhina // *Клінічна генетика і перинатальна діагностика*. – 2013. – Вип. 1. – С. 117.

### *Материалы конференций*

35. Савостьянов К.В. Новые патогенные варианты гена GBA, кодирующего глюкоцереброзидазу, выявленные у пациентов с болезнью Гоше, в российской популяции / К.В. Савостьянов, А.А. Пушков, А.К. Геворкян, О.С. Гундобина, А.Г. Никитин, А.В. Пахомов, Л.В. Муравьева, Г.Б. Мовсисян // *Медицинская генетика*. – 2015. – Том 14, № 4(154). – С. 3. DOI: 10.1234/XXXX-XXXX-2015-4-3-63

36. Светличная, Д. Биохимическая и молекулярно-генетическая диагностика тирозинемии тип 1 / Д. Светличная, Л. Муравьева, Н. Журкова, А. Пушков, К. Савостьянов, С. Полякова, А.Ю. Асанов // *Медицинская генетика*. – 2015. – Т. 14, № 4(154). – С. 7. DOI: 10.1234/XXXX-XXXX-2015-4-3-63

37. Сдвигова, Н.А. Неклассифицируемая кардиомиопатия в рамках моногенных синдромов и хромосомных заболеваний у детей / Н.А. Сдвигова, Е.Н. Басаргина, Л.А. Гандаева, Ю.В. Деревнина, К.В. Савостьянов, Н.В. Журкова // *Медицина: теория и практика*. – 2019. – Т. 4, спецвыпуск: Сборник трудов 3-го национального конгресса с международным участием «Здоровые дети – будущее страны». – С. 504–505.

38. Сладков, Д.Г. Молекулярно-генетическая диагностика семейного аутосомно-рецессивного стероидрезистентного нефротического синдрома / Д.Г. Сладков, А.А. Пушков, Н.С. Аверьянова, Л.В. Муравьева, А.В. Пахомов, А.М. Мазо, А.Н. Цыгин, К.В. Савостьянов // *Молекулярная диагностика 2014 : матер. VIII Всеросс. науч.-практ. конф. с международным участием, Москва, 18–20 марта 2014 г.* – М.: Изд-во МБА, 2014. – С. 243.

39. Ananin, P. A Case of Dense Deposit Disease with Psoriasis in a 2-Year Old Girl / P. Ananin, A. Mazo, O. Komarova, T. Vashurina, A. Pushkov, K. Savostyanov, L. Leonova, P. Povilaitite, A. Tsygin // *Pediatric Nephrology*. – 2015. – Vol. 30, no. 9. – P. 1697.

40. Jourkova, N. Novel Small Deletion of Galc Gene in a Young Russian Boy with Krabe Disease / N. Jourkova, A. Pushkov, K. Savostyanov, N. Nechaeva, L. Kuzenkova // *Journal of Inherited Metabolic Disease*. – 2015. – Vol. 38, no. 1. – P. 370.

41. Kartamysheva, N. Summary of cystinosis data in Russian Federation / N. Kartamysheva, N. Karagulian, K. Savostyanov, A. Pushkov, E. Tsygina, A. Mazo, A. Taranta, A. Tsygin // *Pediatric Nephrology*. – 2014. – Vol. 29, no 9. – P. 1832. – DOI: 10.1007/s00467-014-2904-6

42. Kurbatova, O. Functional Activity of Lymphocytes Mitochondria in Children with Genetically Diagnosed Glycogen Storage Disease of Type I / O. Kurbatova, A. Surkov, S. Polyakova, L. Miroshkina, T. Izmailova, I. Samokhina, E. Kapustina, K. Savostyanov, A Pushkov, S. Petrichuk // *European Journal of Human Genetics*. – 2014. – Vol. 22, no. S1. – P. 418.

43. Lukanina, V. Rare Hereditary Cardiomyopathy Caused by Novel Homozygous Mutation in the MYL3 Gene / V. Lukanina, N. Vashakmadze, N. Zhurkova, K. Savostyanov, A. Pushkov, V. Barskiy, L. Namazova-Baranova // *Archives of Disease in Childhood*. – 2017. – Vol. 102, no. S2. – Pp. A81–A82. DOI: 10.1136/archdischild-2017-313273.211

44. Mazo, A.M. Nephrotic Syndrome and NPHS2 Mutation in Russian Children / A.M. Mazo, A.N. Tsygin, A.A. Pushkov, K.V. Savostyanov // Proc. of the 4th International Conference on Pediatric Chronic Diseases, Disability and Human Development (ICCD 2015), Jerusalem, Israel, 2015, January 20–23. – P. 83.

45. Movsisyan, G.B. Demographic, Clinical and Genetic Characteristics of Children with Gaucher Disease: The Data of Paediatric Registry in Russia / G.B. Movsisyan, O.S. Gundobina, L.S. Namazova-Baranova, K.V. Savostyanov, A.A. Pushkov, V.V. Chernikov, N.N. Mazanova, A.M. Romanyuk, V.I. Smirnov // Archives of Disease in Childhood. – 2017. – Vol. 102, no. S2. – P. A125. DOI: 10.1136/archdischild-2017-313273.322

46. Namazova-Baranova, L.S. 14 Novel Mutations of GLA Gene as a Result of Selective Fabry Disease Screening in Russian Federation / L.S. Namazova-Baranova, K.V. Savostyanov, A.V. Sukhozhenko, A.A. Pushkov, Mazanova N., Pakhomov A., Baranov A.A. // Molecular Genetics and Metabolism. – 2017. – T. 120, no. 1–2 (Suppl). – C. 101.

47. Pushkov, A. Diagnosis of Cystinosis in the Practice of the Russian Diversified Medical Center / A. Pushkov, A. Sukhozhenko, K. Savostyanov, N. Mayansky, A. Tsygin // Journal of Inherited Metabolic Disease. – 2015. – Vol. 38, no. 1. – P. 291.

48. Pushkov, A.A. Four-Years Study in 137 Russian Patients with Mucopolysaccharidosis (MPS) / A.A. Pushkov, K.V. Savostyanov, A.K. Gevorkyan, L.M. Kuzenkova, T.V. Podkletnova, A.V. Pakhomov, L.S. Namazova-Baranova, AA. Baranov // Journal of Inherited Metabolic Disease. – 2016. – Vol. 39, no. 1. – P. 186.

49. Pushkov, A. Glycogen Storage Disease Type 9 is the Most Common Among Cohort of Russian Pediatric Patients with Glycogenosis / A. Pushkov, K. Savost'yanov, L. Namazova-Baranova, A. Surkov, A. Nikitin, I. Zhanin, A. Pakhomov // Journal of Inborn Errors of Metabolism & Screening. – 2017. – Vol. 5. – P. 343. DOI: 10.1177/2326409817722292

50. Pushkov, A. Molecular Description of the First Case of Hunter Syndrome Burdened with Turner Syndrome in Russian Girl / A. Pushkov, K. Savostyanov, S. Trufanov, D. Sladkov, N. Zhurkova, L. Namazova-Baranova // Molecular Genetics and Metabolism. – 2019. – Vol. 126, no. S2. – P. S121.

51. Pushkov, A.A. New Method for the Molecular Genetic Diagnosis of Heritable Disorders of Connective Tissue Using Next-Generation Sequencing (NGS) / A.A. Pushkov, A.G. Nikitin, A.V. Pakhomov, N.V. Zhurkova, K.V. Savostyanov, N.D. Vashakmadze, L.S. Namazova-Baranova // Journal of Inherited Metabolic Disease. – 2014. – Vol. 37, no. 1. – P. 175.

52. Pushkov, A.A. The Utility of Plasma Lyso-GL1 Level as a Biomarker of Gaucher Disease Type 1 in 141 Russian Patients / A.A. Pushkov, K.V. Savostyanov, E.A. Lukina, K.A. Lukina, L.V. Murav'yova, G.B. Movsisyan, R.V. Ponomarev, A.M. Burdenny, L.S. Namazova-Baranova // Journal of Inherited Metabolic Disease. – 2018. – Vol. 41, no. S1. – P. 175.

53. Savostyanov, K.V. 90 Russian Patients with Hunter Syndrome: A Five-Year Experience / K.V. Savostyanov, A.A. Pushkov, N.V. Zhurkova, A.V. Pakhomov, A.G. Nikitin, A.K. Gevorkyan, N.D. Vashakmadze, L.M. Kuzenkova, T.V. Podkletnova, L.S. Namazova-Baranova // Journal of Inherited Metabolic Disease. – 2018. – Vol. 41 (Suppl 1). – P. 174.

54. Savostyanov, K. Alterations of the GBA Gene in 120 Russian Patients with Gaucher Disease / K. Savostyanov, A. Pushkov, A. Gevorkyan, O. Gundobina, E. Lukina, K. Lukina, G. Movsisyan, L. Namazova-Baranova, A. Baranov // Journal of Inherited Metabolic Disease. – 2015. – Vol. 38, no. 1. – P. 272.

55. Savost'yanov, K. Correlation of Lyso-GB3 Level and GLA Mutations in Patients from Screening Cohort Among Dialysis Centers in Russian Federation / K. Savost'yanov, L. Namazova-Baranova, A. Pushkov, N. Mazanova, A. Khrapov, E. Pen'kov // Journal of Inborn Errors of Metabolism & Screening. – 2017. – Vol. 5. – P. 326. DOI: 10.1177/2326409817722292

56. Savostyanov, K. Glucosylfingosine (Lyso-GL1) May Be the Primary Biomarker for Screening Gaucher Disease in Russian Patients / K. Savostyanov, A. Pushkov, L. Murav'ova, G. Movsisyan, A. Rykunova, R. Ponomarev, K. Lukina, E. Lukina, L. Namazova-Baranova // Molecular Genetics and Metabolism. – 2019. – Vol. 126, no. S2. – P. S130. DOI: 10.1016/j.ymgme.2018.12.333

57. Savostyanov, K. Lyso-GB3 Is As a Primary Biomarker for Fabry Disease Screening Among High-Risk Contingents / K. Savostyanov, A. Pushkov, N. Mazanova, L. Pak, L. Kuzenkova, T. Podkletnova, A. Pakhomov, A. Sukhozhenko, S. Moiseev // *Molecular Genetics and Metabolism*. – 2019. – Vol. 126, no. S2. – P. S130. DOI: 10.1016/j.ymgme.2018.12.333
58. Savostyanov, K.V. New Method for Molecular Genetic Diagnosis of Glycogen Storage Disease in Russian Patients Using Next-Generation Sequencing (NGS) / K.V. Savostyanov, A.A. Pushkov, A.N. Surkov, S.I. Polyakova, A.G. Nikitin, L.S. Namazova-Baranova, A.A. Baranov // *Journal of Inherited Metabolic Disease*. – 2016. – Vol. 39, no. 1. – P. 203.
59. Savostyanov, K. Nine Novel Mutations in the Alfa-Galactosidase A Gene in Russian Patients with Fabry Disease / K. Savostyanov, A. Pushkov, A. Pakhomov, L. Namazova-Baranova, A. Baranov // *Journal of Inherited Metabolic Disease*. – 2015. – Vol. 38, no. 1. – P. 271.
60. Savostyanov, K. Novel Mutations and Genetic Diagnosis of Heritable Disorders of Connective Tissue Using Next-Generation Sequencing (NGS) / K. Savostyanov, A. Pushkov, T. Margieva, N. Vashakmadze, G. Yakhyaeva, L. Namazova-Baranova, A. Baranov // *Community, Diversity, Vitality : Proc. of the 28th International Pediatric Congress, Vancouver, Canada, 2016, August 17–22*. – P. 374.
61. Savostyanov, K. Novel Mutations in Children with Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome in Russian Population / K. Savostyanov, D. Sladkov, A. Tsygin, A. Pushkov, I. Zhanin, L. Namazova-Baranova, A. Baranov // *Archives of Disease in Childhood*. – 2017. – Vol. 102 (Suppl 2). – Pp. A24–A25. DOI: 10.1136/archdischild-2017-313273.63
62. Savostyanov, K. Selective Screening for Nephropathic Cystinosis Among High-Risk Contingents of the Children Population in Russia / K. Savostyanov, A. Pushkov, N. Zhurkova, N. Mazanova, L. Muravyova, A. Pakhomov, P. Ananin, T. Vashurina, A. Tsygin, A. Fisenko // *Molecular Genetics and Metabolism*. – 2020. – Vol. 129, no. 2. – P. S144. DOI: 10.1016/j.ymgme.2019.11.380
63. Sladkov, D. High Prevalence of WT1 Gene Mutations in Patients with Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome // D. Sladkov, K. Savostyanov, A. Nikitin, N. Zhurkova, A. Pakhomov, A. Rykunova, P. Anan'in, A. Tsygin // *Archives of Disease in Childhood*. – 2019. – Vol. 104, no. S3 (A1–A428). – P. A4. DOI: 10.1136/archdischild-2019-epa.8
64. Sladkov, D.G. The Use of Next Generation Sequencing Technology for Molecular Diagnostics of Nephrotic Syndrome / D.G. Sladkov, K.V. Savostyanov // *Наука и медицина: современный взгляд молодежи : матер. III Междунар. науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых, посвященной 25-летию независимости республики Казахстан, Алма-Ата, 21–22 апреля 2016 г.* – 2016. – С. 166–167.
65. Surkov, A. Dynamics OF Serum Concentrations of Glycose, Lactate, ALT, AST and GGT in Children with glycogen storage disease IA and IB Subtypes During Long-Term Therapy / A. Surkov, A. Baranov, L. Namazova-Baranova, K. Karulina, A. Potapov, N. Semjonova, A. Gevorkjan, K. Savost'janov, A. Pushkov, N. Zhurkova, M. Shilova // *Community, Diversity, Vitality : Proc. of the 28th International Pediatric Congress, Vancouver, Canada, 2016, August 17–22*. – P. 612.
66. Tsygin, A. Is Cyclosporine a Efficient in Charcot-Marie Tooth Disease Associated Nephropathy / A. Tsygin, O. Zrobok, A. Mazo, L. Leonova, A. Pushkov, O. Globa, K. Savostyanov // *Pediatric Nephrology*. – 2014. – Vol. 29, no 9. – Pp. 1822–1823. DOI: 10.1007/s00467-014-2904-6
67. Vashakmadze, N.D. The Study of Hemostasis System and Polymorphism in the Genes of Coagulation in Patients with Mucopolysaccharidosis Type II / N.D. Vashakmadze, O.B. Gordeeva, V.V. Botvinyeva, L.S. Namazova-Baranova, A.K. Gevorkyan, L.M. Kuzenkova, T.V. Podkletnova, K.V. Savostyanov, A.A. Pushkov // *Archives of Disease in Childhood*. – 2017. – Vol. 102, no. S2. – P. A172. DOI: 10.1136/archdischild-2017-313273.448
68. Zhurkova, N.V. 1P36 Deletion Syndrome in Children with Cardiomyopathy: Two Clinical Cases / N.V. Zhurkova, A.A. Pushkov, K.V. Savostyanov, E.N. Basargina, A.V. Pakhomov, V.S. Ermolenko, Y.V. Derevianina // *Archives of Disease in Childhood*. – 2017. – Vol. 102, no. S2. – Pp. A63–A64. DOI: 10.1136/archdischild-2017-313273.165
69. Zhurkova, N. Deletion of Chromosomal Region Xq28 Cause of Hunter Syndrome in a Patient with Mild Clinical Phenotype / N. Zhurkova, K. Savostyanov, A. Pushkov, T. Podkletnova, N.

Vashakmadze, E. Penkov, L. Kuzenkova // *Molecular Genetics and Metabolism*. – 2019. – Vol. 126, no. 2 (Special Issue). – P. S156. DOI: 10.1016/j.ymgme.2018.12.406

70. Zhurkova, N. High Prevalence Noonan Syndrome in Russian Children with Hypertrophic Cardiomyopathy, Diagnosed by Next Generation Sequencing / N. Zhurkova, K. Savostyanov, A. Pushkov, N. Vashakmadze, N. Fedorova, O. Zharova, L. Gandaeva, N. Sdvigova, O. Kondakova, E. Basargina // *Archives of Disease in Childhood*. – 2019. – Vol. 104, no. S3 (A1–A428). – P. A42. DOI: 10.1136/archdischild-2019-epa.99

### ***Патенты на изобретения и полезные модели***

71. Патент 2621161 Российская Федерация, МПК G01N 33/50, C12Q 1/68 : Способ диагностики гликогеновой болезни IXa типа у детей с использованием технологии секвенирования нового поколения / А.А. Баранов, Л.С. Намазова-Баранова, К.В. Савостьянов, А.А. Пушков, И.С. Жанин, А.Н. Сурков. – Заявитель и патентообладатель ФГБУ «НЦЗД» Минздрава России. – № 2016103669; заявл. 04.02.2016; опубл. 31.05.2017, Бюл. № 16. – 8 с.

72. Патент 2621162 Российская Федерация, МПК G01N 33/50, C12Q 1/68 : Способ диагностики врожденного нефротического синдрома финского типа у детей с использованием технологии секвенирования нового поколения / А.А. Баранов, Л.С. Намазова-Баранова, К.В. Савостьянов, А.А. Пушков, А.Н. Цыгин, Т.Н. Маргиева. – Заявитель и патентообладатель ФГБУ «НЦЗД» Минздрава России. – № 2016103672; заявл. 04.02.2016; опубл. 31.05.2017, Бюл. № 16. – 8 с.

### ***Монографии***

73. Атлас редких болезней / А.А. Баранов, Л.С. Намазова-Баранова, Е.И. Алексеева, К.В. Савостьянов [и др.]. – М.: ПедиатрЪ, 2013. – 304 с.

74. Атлас редких болезней / Э.А. Абашидзе, А.А. Баранов, Л.С. Намазова-Баранова, К.В. Савостьянов [и др.]. – М.: ПедиатрЪ, 2016. – 419 с. – Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/70788.html>.

### ***Клинические рекомендации***

75. Клинические рекомендации : Болезнь Гоше у детей. МКБ 10 : E75.2 / С.А. Баранов, Л.С. Намазова-Баранова, С.И. Куцев, К.В. Савостьянов [и др.]; Союз педиатров России. – Утв. Минздравом России. – М., 2016. – 28 с. – Режим доступа: [http://www.pediatr-russia.ru/sites/default/files/file/kr\\_pompe.pdf](http://www.pediatr-russia.ru/sites/default/files/file/kr_pompe.pdf).

76. Клинические рекомендации : Болезнь Фабри. МКБ 10 : E75.2 / С.И. Куцев, А.А. Баранов, Л.С. Намазова-Баранова, К.В. Савостьянов [и др.]; Ассоциация медицинских генетиков; Союз педиатров России. – Утв. Минздравом России. – М., 2019. – 48 с. – Режим доступа: <http://amg-genetics.ru/pdf/fabri.pdf>.

77. Клинические рекомендации : Мукополисахаридоз I типа у детей. МКБ 10 : E76.0 / А.А. Баранов, Л.С. Намазова-Баранова, С.И. Куцев, К.В. Савостьянов [и др.]; Союз педиатров России. – Утв. Минздравом России. – М., 2016. – 36 с. – Режим доступа: [http://www.pediatr-russia.ru/sites/default/files/file/kr\\_mps1.pdf](http://www.pediatr-russia.ru/sites/default/files/file/kr_mps1.pdf).

78. Клинические рекомендации : Мукополисахаридоз II типа у детей. МКБ 10 : E76.1 / А.А. Баранов, Л.С. Намазова-Баранова, С.И. Куцев, К.В. Савостьянов [и др.]; Союз педиатров России. – Утв. Минздравом России. – М., 2016. – 31 с. – Режим доступа: [http://www.pediatr-russia.ru/sites/default/files/file/kr\\_mps2.pdf](http://www.pediatr-russia.ru/sites/default/files/file/kr_mps2.pdf).

79. Клинические рекомендации : Наследственная тирозинемия I типа у детей. МКБ 10 : E70.2 / А.А. Баранов, Л.С. Намазова-Баранова, Т.В. Боровик, К.В. Савостьянов [и др.]; Союз педиатров России. – Утв. Минздравом России. – М., 2016. – 38 с. – Режим доступа: [http://www.pediatr-russia.ru/sites/default/files/file/kr\\_nastir.pdf](http://www.pediatr-russia.ru/sites/default/files/file/kr_nastir.pdf).