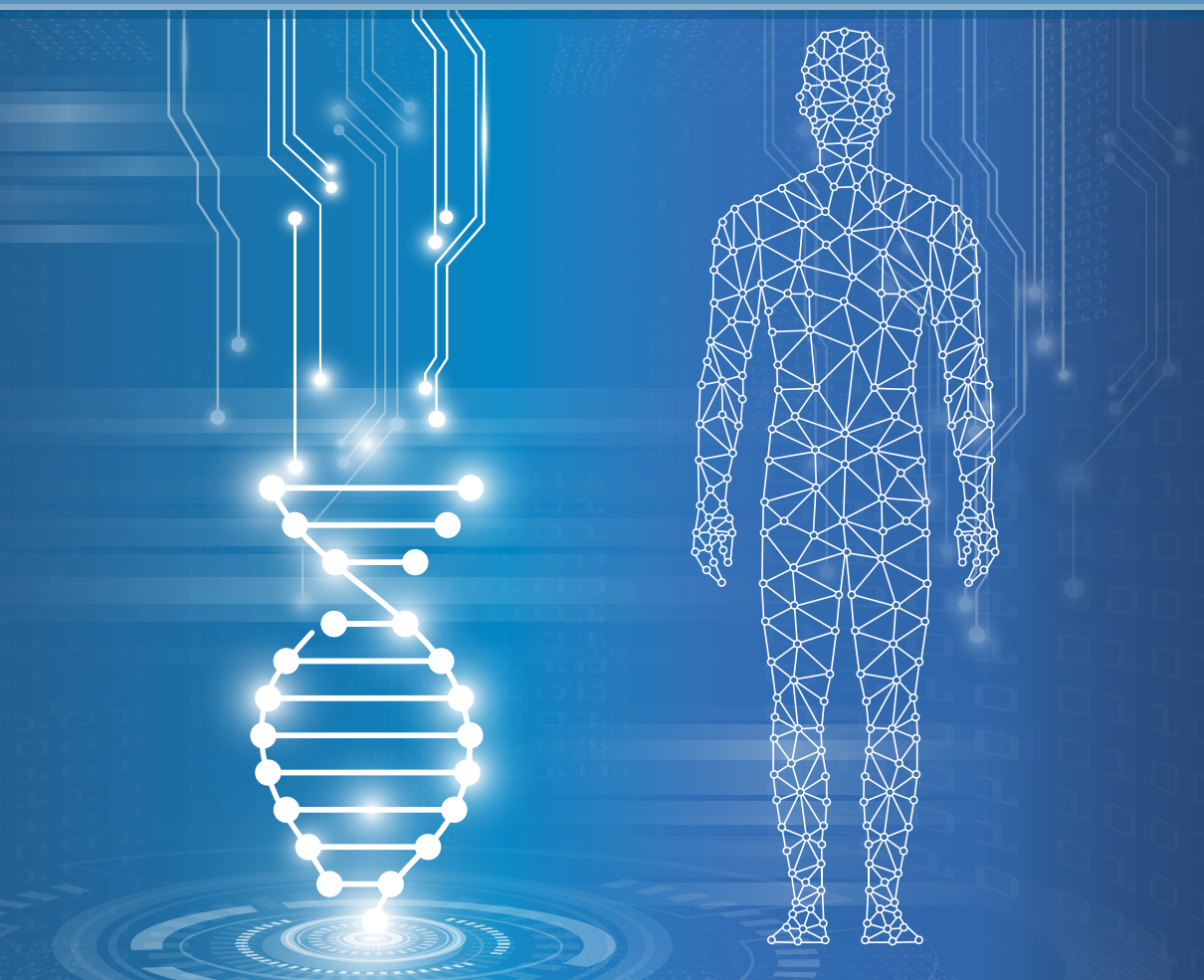


Федеральное государственное автономное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

САВОСТЬЯНОВ К.В.

СОВРЕМЕННЫЕ АЛГОРИТМЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ РЕДКИХ НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ У РОССИЙСКИХ ПАЦИЕНТОВ



ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России

Савостьянов К. В.

СОВРЕМЕННЫЕ АЛГОРИТМЫ
ГЕНЕТИЧЕСКОЙ
ДИАГНОСТИКИ РЕДКИХ
НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ
У РОССИЙСКИХ ПАЦИЕНТОВ

Москва, 2022

УДК 616-008.9:576.311.344-07-056.7(470+571)

ББК 54.152.3-45(2Рос)+53.2(2Рос)

С13

РЕЦЕНЗЕНТЫ:

Гинтер Евгений Константинович, доктор биологических наук, профессор, академик РАН, научный руководитель ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Заслуженный деятель науки Российской Федерации

Румянцев Александр Григорьевич, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, Президент ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева», Заслуженный врач Российской Федерации

РЕДАКТОРЫ:

Фисенко Андрей Петрович, доктор медицинских наук, профессор, директор ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, заслуженный врач Российской Федерации.

Поляков Александр Владимирович, доктор биологических наук, профессор РАН, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией молекулярно-генетической диагностики ФГБНУ «Медико-генетический центр имени академика Н.П. Бочкова».

Савостьянов, К. В.

С13 Современные алгоритмы генетической диагностики редких наследственных болезней у российских пациентов / К. В. Савостьянов. — М.: ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, 2022. — 452 с.

ISBN 978-5-6047928-7-2

Монография посвящена одной из приоритетных задач современной медицинской генетики – биохимической и молекулярно-генетической диагностике редких наследственных болезней.

В работе описаны результаты широкомасштабного исследования, проведенного на уникальных и репрезентативных выборках российских пациентов, подробно описаны клинические, геногеографические и фенотипические особенности российских пациентов с лизосомными болезнями накопления, нарушениями обмена аминокислот, гликогеновыми болезнями, несовершенным остеогенезом, нефротическим синдромом и кардиомиопатиями. В монографии освещены аспекты популяционной генетики, описаны новые патогенные варианты генома, а также мажорные мутации, характерные для определенных этносов, населяющих территорию Российской Федерации, предложены алгоритмы генетической диагностики редких наследственных болезней с использованием современных диагностических платформ: тандемной масс-спектрометрии и массового параллельного секвенирования.

Монография адресована широкому кругу специалистов, работающих в области персонализированной медицины, в том числе специалистам клинической и лабораторной генетики, педиатрам, неврологам, гастроэнтерологам, нефрологам, кардиологам, врачам других специальностей.

ISBN 978-5-6047928-7-2



9 785604 792872

УДК 616-008.9:576.311.344-07-056.7(470+571)

ББК 54.152.3-45(2Рос)+53.2(2Рос)

© Савостьянов К.В, 2022

© ФГАУ «НМИЦ здоровья детей»
Минздрава России, 2022

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	8
Глава 1. Наследственные болезни обмена	14
1.1. Лизосомные болезни накопления	15
1.1.1. Болезнь Гоше	21
1.1.1.1. Селективный скрининг болезни Гоше у российских пациентов	26
1.1.1.2. Клинические, географические и генетические особенности болезни Гоше.....	28
1.1.1.3. Описание новых патогенных вариантов гена <i>GBA</i>	35
1.1.1.4. Генотип-фенотипические корреляции	36
1.1.1.5. Оптимизация алгоритма генетической диагностики болезни Гоше.....	39
1.1.1.6. Выводы.....	41
1.1.2. Болезнь Фабри	42
1.1.2.1. Селективный скрининг болезни Фабри у российских пациентов	47
1.1.2.2. Клинические, географические и генетические особенности болезни Фабри.....	49
1.1.2.3. Описание новых патогенных вариантов гена <i>GLA</i> ...	56
1.1.2.4. Генотип-фенотипические корреляции	58
1.1.2.5. Оптимизация алгоритма генетической диагностики болезни Фабри.....	64
1.1.2.6. Выводы.....	66

1.1.3. Мукополисахаридозы	67
1.1.3.1. Мукополисахаридоз, тип I	70
1.1.3.2. Мукополисахаридоз, тип II	88
1.1.4. Цистиноз	106
1.1.4.1. Селективный скрининг цистиноза у российских пациентов	112
1.1.4.2. Клинические, географические и генетические особенности цистиноза	113
1.1.4.3. Описание новых патогенных и вероятно патогенных вариантов гена <i>CTNS</i>	118
1.1.4.4. Генотип-фенотипические корреляции	119
1.1.4.5. Мониторинг терапии цистиноза	121
1.1.4.6. Оптимизация алгоритма генетической диагностики цистиноза	122
1.1.4.7. Выводы	123
1.2. Наследственные болезни нарушения аминокислот.	
Тирозинемия, тип I	124
1.2.1. Селективный скрининг тирозинемии, тип I у российских детей	130
1.2.2. Географические, клинические и генетические особенности тирозинемии, тип I	132
1.2.3. Описание новых патогенных вариантов гена <i>FAH</i>	136
1.2.4. Мониторинг терапии тирозинемии, тип I	137
1.2.5. Оптимизация алгоритма генетической диагностики тирозинемии, тип I	140
1.2.6. Выводы	141
1.3. Наследственные болезни накопления гликогена	141
1.3.1. Гликогеновые болезни с преимущественным поражением печени	143
1.3.1.1. Гликогеновая болезнь, тип I. Болезнь Гирке	143
1.3.1.2. Гликогеновая болезнь, тип III. Болезнь Форбса. Болезнь Кори	148

1.3.1.3. Гликогеновая болезнь, тип IV. Болезнь Андерсена, амилопектиноз	156
1.3.1.4. Гликогеновая болезнь, тип VI. Болезнь Герса.....	163
1.3.1.5. Болезнь накопления гликогена, тип IX. Болезнь Хага	166
1.3.1.6. Изучение молекулярных основ гликогеновых болезней с преимущественным поражением печени у российских пациентов	170
1.3.2. Болезнь Помпе	190
1.3.2.1. Селективный скрининг болезни Помпе у российских пациентов	197
1.3.2.2. Клинические и генетические особенности болезни Помпе у российских пациентов	198
1.3.2.3. Описание новых патогенных вариантов гена GAA	202
1.3.2.4. Генотип-фенотипические корреляции	205
1.3.2.5. Оптимизация алгоритма генетической диагностики болезни Помпе.....	205
1.3.2.6. Выводы.....	206

Глава 2. Несовершенный остеогенез 208

2.1. Селективный скрининг несовершенного остеогенеза у российских пациентов	220
2.2. Клинические, географические и генетические особенности несовершенного остеогенеза	221
2.3. Генотип-фенотипические корреляции	232
2.4. Описание новых патогенных вариантов генов COL1A1, COL1A2, IFITM5 и SERPINF1	235
2.5. Выводы	239

Глава 3. Нефротический синдром..... 240

3.1. Изучение молекулярных основ нефротического синдрома у российских детей..... 254

3.1.1. Селективный скрининг нефротического синдрома..... 254

3.1.2. Клинические, географические и молекулярно-генетические особенности нефротического синдрома 255

3.1.3. Генотип-фенотипические корреляции, выявленные при описании новых вариантов в изученных генах 272

3.1.4. Распределение мутаций изученных генов в соответствии с локализацией и функциональным вкладом их продуктов 278

3.1.5. Изучение влияния обнаруженных мутаций на возраст манифестации нефротического синдрома..... 279

3.1.6. Корреляция выявленных мутаций с гистологической картиной нефротического синдрома..... 282

3.1.7. Оптимизация алгоритма генетической диагностики нефротического синдрома 284

3.1.8. Выводы 285

Глава 4. Кардиомиопатии 288

4.1. Гипертрофическая кардиомиопатия..... 289

4.2. Дилатационная кардиомиопатия 296

4.3. Рестриктивная кардиомиопатия 300

4.4. Аритмогенная кардиомиопатия 302

4.5. Некомпактная кардиомиопатия 304

4.6. Изучение молекулярных основ кардиомиопатий у российских детей..... 309

4.6.1. Селективный скрининг кардиомиопатий 309

4.6.2. Клинические, географические и генетические особенности кардиомиопатий 310

4.6.3. Генотип-фенотипические корреляции	329
4.6.4. Распределение мутаций изученных генов в соответствии с локализацией и функциональным вкладом их продуктов	334
4.6.5. Описание новых вариантов изученных генов	335
4.6.6. Выводы	336
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	338
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	341
Приложение А. Характеристика выборок и материала для исследований.....	344
Приложение Б. Измерение активности лизосомных ферментов... ..	347
Приложение В. Измерение концентрации тирозина и сукцинилацетона.....	353
Приложение Г. Измерение концентрации цистина.....	355
Приложение Д. Измерение концентрации глоботриаозилсфингозина.....	358
Приложение Е. Измерение концентрации гликозилсфингозина....	360
Приложение Ж. Выделение геномной ДНК.....	362
Приложение З. Подбор и синтез олигонуклеотидов.....	363
Приложение И. Полимеразная цепная реакция	364
Приложение К. Секвенирование методом Сэнгера	365
Приложение Л. Высокопроизводительное секвенирование.....	366
Приложение М. Мультиплексная лигазозависимая амплификация проб	368
Приложение Н. Количественная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени.....	369
Приложение О. Алгоритм генетической диагностики редких наследственных болезней	370
Приложение П. Молекулярно-цитогенетические исследования	371
Приложение Р. Биоинформатический анализ	372
Приложение С. Статистическая обработка результатов исследований.....	373
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	374

ВВЕДЕНИЕ

Наследственные болезни¹ – генетически обусловленные заболевания, возникающие и развивающиеся вследствие нарушений в процессах хранения, передачи и реализации генетической информации. Существует описание более 10 000 различных генетически обусловленных болезней [408], 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 [14, 737, 906]. При этом ежегодно описывается 250–280 новых заболеваний [239]. Результаты ряда эпидемиологических исследований позволяют предположить, что основная часть разнообразия наследственной патологии приходится на редкие формы наследственных заболеваний, а основная часть больных – на частые формы [14]. В большинстве развитых стран редкими болезнями считаются болезни, частота встречаемости которых не превышает 5 случаев на 10 000 живых новорожденных [904]. При этом от редких болезней страдают миллионы людей во всем мире [112], составляя примерно 6–8% населения земного шара [172]. 30% детей с такими болезнями не доживают до 5 лет, при этом 35% летальных исходов приходится на первый год жизни ребенка [388]. В Канаде было подсчитано, что в совокупности на моногенные заболевания может приходиться до 40% работы стационарных педиатрических центров [854], подчеркивая значимость существующей проблемы для современного здравоохранения. Поэтому усилия, направленные на устранение таких болезней, должны быть в первую очередь сконцентрированы на их раннем выявлении.

Актуальность ранней диагностики особенно очевидна для наследственных болезней, имеющих патогенетическое лечение, своевременное получение которого позволяет приостановить необратимые, а в большинстве случаев фатальные изменения органов и тканей паци-

¹ В настоящем исследовании номенклатура болезней приведена в соответствии с международной классификацией наследственных заболеваний человека OMIM (сокр. от англ. Online Mendelian Inheritance in Man) [725].



ентов, 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. В основе патогенеза наследственных нарушений обмена веществ лежат мутации генов, кодирующих ферменты, обеспечивающие превращение субстратов в продукты, что, в свою очередь, приводит к накоплению субстратов до блока либо дефектов производства и использования энергии, вызванного дефицитом продуктов, за пределами блока.

Несмотря на то что в развитых странах тратятся огромные человеческие и материальные ресурсы на развитие генетических методов молекулярной диагностики, позволяющих выявлять первопричину развития наследственных заболеваний, на сегодняшний момент времени для подавляющего большинства наследственных болезней обмена веществ значительно проще, быстрее и дешевле проводить генетическую диагностику биохимическими методами. Однако лишь молекулярно-генетическая диагностика помогает установить причину развития любого наследственного заболевания, служит единственным способом выявления носительства мутантных генов в отягощенных семьях, оптимальна для персонализации лечения, проведения преимплантационной и пренатальной диагностики, а также служит ускорителем получения фундаментальных научных знаний, являясь, в составе геномики, неотъемлемой частью совокупных омик-платформ. Совершенствование молекулярно-генетической диагностики сводится к изобретению новых технологий секвенирования ДНК и биоинформатического анализа, позволяющих прочитывать огромные массивы геномной информации, выявляя редкие нуклеотидные варианты и определяя их патогенность, тогда как совершенствование биохимической диагностики сводится к разработке новых протоколов для качественного и количественного определения отдельных метаболитов, в том числе ферментов и прочих биомаркеров, в различных биологических жидкостях организма. На данный момент полногеномное секвенирование можно считать единственной технологической платформой для одновременной диагностики подавляющего большинства наследственных болезней человека, причиной развития которых служат патогенные изменения первичной структуры ДНК, однако дороговизна и сложность интерпретации результатов таких исследований пока не дает возможности использовать их повсеместно в качестве рутинной диагностики, к примеру, при массовом скрининге новорожденных. Однако научные данные последних лет указывают на то, что уже сейчас в 57% случаев подобные исследования являются единственной возможностью точной диагностики генетических болез-

ней, позволяющей избежать длительного клинического поиска [1020]. Тогда как технология тандемной масс-спектрометрии, мультиплексно выявляющая более 50 различных наследственных состояний в одном пятне крови, высушенной на фильтровальной бумаге, зачастую дает ложноположительные результаты из-за сдвига границ, разделяющих норму и патологию, в сторону последней, а также потери специфичности методик в угоду их чувствительности. Кроме того, до сих пор не представляется возможным стандартизировать все условия проведения диагностики наследственных болезней обмена ввиду невозможности полной автоматизации исследования, использования одного и того же оборудования, реактивов и расходных материалов, а низкая частота отдельных нозологических форм не позволяет должным образом валидировать существующие методики. Поэтому наиболее эффективным алгоритмом генетической диагностики наследственных болезней обмена считается двухэтапная диагностика, на первом этапе которой с помощью тандемной масс-спектрометрии отделяются единичные биологические образцы с параметрами, отличными от нормальных референсных значений, после чего они подвергаются подтверждающей молекулярно-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. Большинство наследственных болезней, имеющих эффективное патогенетическое лечение, должны выявляться в неонатальном периоде до возникновения необратимых изменений в тканях и органах больных детей! Актуальность совершенствования методов диагностики наследственных болезней не ограничивается неонатальным скринингом. 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 недопущения 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 должны оздоровить популяцию, благодаря сокращению новых случаев возникновения заболеваний.



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. Для таких групп болезней секвенирование методом Сэнгера может повлечь за собой неоправданные материальные и трудовые затраты. В настоящее время для этих целей успешно применяется технология высокопроизводительного секвенирования [889].

Настороженность педиатров и профессионализм врачей-генетиков позволяет очертить спектр предполагаемых патологических состояний, назначив диагностику одного заболевания, либо группы болезней в зависимости от фенотипа конкретного ребенка.

Алгоритмы генетической 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.

В России с начала 90-х годов прошлого века проводятся исследования, посвященные генетической диагностике различных классов наследственных болезней, включая наследственные болезни обмена. Пионерами в этой области являются ученые из Медико-генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова, в основе работ которых, в том числе и диссертационных, лежат преимущественно методы скрининговой диагностики с использованием биохимической флуориметрии, либо масс-спектрометрии в лейкоцитах крови [7, 8, 16, 996], потому как практическое применение технологии высокопроизводительной тандемной масс-спектрометрии в сухих пятнах крови стало доступно для рутинной диагностики совсем недавно [15, 21]. Кроме того, в работах, посвященных диагностике наследственных болезней, не часто описывают клинические особенности пациентов. Это не позволяет оценить генотип-фенотипические корреляции, из-за чего во многих случаях теряется возможность персонализированно прогнозировать течение болезни на основе выявленного генотипа.

Следует отметить, что в российских научных изданиях малочисленны работы по диагностике болезней Гоше [3, 17], Фабри [10, 11] и Помпе [33, 53, 61] среди педиатрической когорты пациентов. Кроме того, существенным пробелом по сравнению с зарубежным научным сообществом становится недостаточная публикационная активность российских исследователей, использующих технологию высокопроиз-

водительного секвенирования в диагностике групп генетически детерминированных заболеваний, схожих по фенотипу, таких как нефротический синдром, гликогеновые болезни и кардиомиопатии. Единичные работы российских авторов в этой области, описывающие отдельные нозологии, выполнены преимущественно на когортах взрослых пациентов [31, 43, 48], тогда как статьи, посвященные исследованиям на репрезентативных выборках детей, в отечественной литературе найти не удалось.

В монографии описаны результаты научной работы, выполненной с использованием выборки из 32 922 пациентов, генетическая диагностика которых осуществлялась в соответствии с разработанным нами алгоритмом, представленным в приложении О. Приведены результаты скрининга 31 893 российских пациентов с подозрением на болезни Фабри, Гоше, Помпе, МПС I и II, тирозинемия, тип I, цистиноз. Впервые показано, что накапливаемые в организме глоботриаозилсфингозин и гликозилсфингозин могут являться биомаркерами для первичного скрининга российских пациентов с болезнями Фабри и Гоше. Впервые в России показано, что концентрации цистина, сукцинилацетона, глоботриаозилсфингозина и гликозилсфингозина достоверно различаются у пациентов с цистинозом, тирозинемией, тип I, болезнями Фабри и Гоше соответственно до начала патогенетической терапии и во время ее проведения. Проведен скрининг 554 детей с подозрением на моногенные формы стероидрезистентного нефротического синдрома, гликогеновой болезни, несовершенного остеогенеза и кардиомиопатий. Впервые установлены доли различных типов гликогеновой болезни, нефротического синдрома, несовершенного остеогенеза и кардиомиопатий у российских детей, а также определен спектр мутаций, их вызывающий. Впервые в мире описан 321 новый нуклеотидный вариант генома человека, среди них патогенных вариантов – 212, вероятно патогенных – 73, вариантов с неизвестной патогенностью, не аннотированных в базе данных HGMD до проведения настоящего исследования, – 36. Для большинства указанных вариантов дано описание вызываемых ими фенотипических проявлений болезней. Впервые в мире показано наличие характерных для российских детей мутаций генов *CTNS*, *AGL*, *PYGL*, *PHKA2*, *PHKG2*, *RAF1*, *IFITM5*, *NPHS2*, *WT1*, *NPHS1* и *SMARCAL1*, а также определены их относительные частоты.

За использование в работе над монографией данных, полученных в соавторстве с сотрудниками лаборатории наследственных болезней обмена ФГБНУ «МГНЦ имени академика Н.П. Бочкова», с сотрудниками отделения орфанных заболеваний ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, с сотрудниками кафедры внутренних, профессиональных болезней и ревматологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ



им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовского Университета), автор монографии благодарит д.м.н., профессора Е.Ю. Захарову; д.м.н., профессора Е.А. Лукину; д.м.н., профессора С.В. Моисеева; д.м.н., профессора кафедры госпитальной педиатрии им. академика В.А. Таболина ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России С.И. Полякову.

Кроме того, в разные годы методы и алгоритмы генетической диагностики редких наследственных болезней у российских пациентов практически применялись автором в совместных исследованиях с различными подразделениями ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, в том числе 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).

ГЛАВА 1

НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ ОБМЕНА

Наследственные болезни обмена (НБО) являются существенной причиной заболеваемости и смертности пациентов во всем мире, особенно в педиатрической возрастной группе [639]. В настоящее время описано около 1000 различных НБО. Несмотря на то что в литературе часто приводятся данные о кумулятивной заболеваемости, которая варьирует от 1 случая на 1500 до 1 случая на 5000 живых новорожденных [99, 331, 863], недавнее ретроспективное исследование этнически разнообразного населения Соединенного Королевства показало, что распространенность НБО составляет 1 случай на 784 живых новорожденных [825].

Британский врач Арчибальд Гаррод был первым человеком, разработавшим концепцию «метаболического блока» как основы патогенеза НБО, описав ее на примере алкаптонурии в 1902 году и позднее в 1923 году в своем труде «Врожденные нарушения обмена веществ» [365]. Эти труды послужили толчком к описанию большого количества НБО, причиной развития которых служат мутации генов, кодирующих ферменты, катализирующие превращение одних веществ в другие. Именно низкая активность ферментов, способ-



ных расщепить субстраты, либо увеличенное количество субстратов, накапливающихся в организме, служат биохимическими маркерами для скрининга на эти наследственные патологии. НБО обусловлены патогенными вариантами генов, продукты которых вовлечены в различные метаболические процессы либо играют роль внутриклеточных рецепторов. К развитию заболеваний данной группы приводит патологическое накопление промежуточных метаболитов, предшествующих ферментативному блоку и дефицит конечных метаболитов. В зависимости от характера метаболита, выделяют несколько групп НБО, включая болезни обмена аминокислот (аминоацидопатии), углеводов (наследственные нарушения обмена углеводов), органических кислот (органические ацидурии), липидов, нуклеотидов, стероидных гормонов, металлов и другие. К НБО относятся так называемые лизосомные болезни накопления (ЛБН), которые объединяют более 50 редких наследственных метаболических заболеваний, связанных с нарушениями функции лизосом [333].

1.1. ЛИЗОСОМНЫЕ БОЛЕЗНИ НАКОПЛЕНИЯ

Первыми клиническими описаниями ЛБН были работы У. Тея [922], Ф. Гоше [366] и Б. Сакса [821], сделанные в конце XIX века. За почти полуторавековую историю медицины научились быстро распознавать болезнь и оказывать качественную квалифицированную помощь пациентам с ЛБН, разобравшись в причинах и механизмах развития большинства состояний. Каждое, отдельно взятое состояние является редким, тогда как суммарную частоту всех ЛБН специалисты в среднем оценивают как 1 : 5000–10 000 живых новорожденных [353, 655]. Эта оценка может быть занижена в связи с неучтенными случаями младенческой смертности вследствие тяжелых форм ЛБН, а также неучтенными случаями мягкого течения легких форм ЛБН с поздним началом. Некоторые болезни встречаются в одних популяциях гораздо чаще, чем в других, благодаря так называемому «эффекту основателя», например, болезнь Ниманна–Пика, тип А среди евреев ашкенази [845]. Первопричиной развития ЛБН являются мутации генов, кодирующих лизосомные гидролазы, рецепторы, трансмембранные белки, активаторы и переносчики, вызывая прогрессирующее лизосомное накопление субстратов, специфичных для каждого заболевания, приводя в итоге к потере клеточной и тканевой функции лизосом [713].

ЛБН чаще всего классифицируются в соответствии с химической классификацией накапливаемого субстрата (сфинголипидозы, мукополисахаридозы, муколипидозы, липидозы, олигосахаридозы, гликогенозы) и дефектами лизосомного транспорта [608]. Подавляющее большинство ЛБН наследуется по аутосомно-рецессивному типу, исключением являются: болезнь Хантера, наследуемая по X-сцепленному рецессивному типу, болезнь Данон, наследуемая по X-сцепленному доминантному типу, и болезнь Фабри, наследуемая по X-сцепленному типу. Некоторые ЛБН формируют один клинический фенотип, который может быть вызван мутациями различных генов. Например, дефицит четырех различных ферментов приводит к развитию мукополисахаридоза, тип III [330]. И наоборот, мутации одного гена могут вызывать разные клинические проявления в зависимости от мутаций, остаточной активности фермента и взаимодействия с белками-модификаторами. Например, для болезни Гоше описаны 3 различные формы болезни: ненеуропатическая, нейропатическая инфантильная и нейропатическая ювенильная [143]. Возраст манифестации, тяжесть течения, поражение органов и тканей может значительно варьировать у разных пациентов с одной патологией, даже в пределах одной семьи. Так, у одной из двух сестер в одной семье болезнь Фабри может протекать бессимптомно, а у другой – с клиническими проявлениями, сравнимыми по тяжести с клиническими проявлениями болезни Фабри у их общего брата за счет различной степени инактивации X-хромосомы, содержащей мутацию [315].

Как правило, ЛБН проявляются уже на первом году жизни неспецифическими симптомами, которые маскируют истинное заболевание под различную соматическую патологию. С возрастом острота и спектр клинических проявлений ЛБН возрастает [1036]. В связи с очень быстрым, иногда молниеносным развитием клинической картины чрезвычайно важно установить точный диагноз на ранних этапах жизни больного, включая стадию внутриутробного развития. Последнее достигается с помощью методов пренатальной диагностики.

С 60-х годов прошлого века в США проводятся государственные программы обязательного скрининга новорожденных на наличие НБО. При этом программы неонатального скрининга ЛБН существенно отставали от программ диагностики других НБО до наступления XXI века. Разработка новых препаратов для патогенетической терапии ЛБН, а также аналитические разработки для ферментативного тестирования образцов крови, высушенных на фильтровальной бумаге, позволили включить ряд ЛБН в массовый скрининг новорожденных. Так, в США с 2012 года действует обновленная федеральная программа скрининга НБО, включающая 28 основных патологий и 26 вторичных патологий



[213]. С 2014 года введена программа обязательного скрининга новорожденных на пять ЛБН, включая сфинголипидозы (болезни Гоше, Ниманна-Пика и Фабри), гликогеноз, тип II (болезнь Помпе) и болезнь Краббе [813]. В некоторых штатах США запущены пилотные проекты по скринингу новорожденных на мукополисахаридоз, тип I и тип II [512]. Аналогичная пилотная программа по скринингу новорожденных на мукополисахаридоз, тип I с недавнего времени действует на Тайване [577]. В Германии обязательная программа скрининга новорожденных на НБО в 2005 году была расширена с 3 до 14 заболеваний, что позволило за три года провести скрининг почти 2,8 млн новорожденных и выявить 1932 больных, что на 92% превысило число пациентов, выявленных до расширения скрининговой программы [420].

Возможность обнаружения дефицита лизосомных ферментов в сухих пятнах крови была впервые продемонстрирована Шамоле и коллегами на примере мукополисахаридоза, тип I, болезней Гоше, Ниманна-Пика, тип A и B, Тея-Сакса и Сандхоффа [217], обнаруживших стабильность ферментативной активности в сухих пятнах крови, хранящихся в холодильнике или морозильной камере в течение 21 дня, а при комнатной температуре – в течение 20 дней, доказав также путем ретроспективного анализа сухих пятен крови, изъятых у больных пациентов и хранящихся при комнатной температуре в течение нескольких месяцев, корректную идентификацию пациентов с болезнями Гоше, Ниманна-Пика, тип A и B, GM1- и GM2-ганглиозидозами [218, 219]. Эти флуориметрические анализы являются недорогими и могут быть легко автоматизированы, однако способность к их мультиплексированию ограничена. Профессор Гелб с коллегами из Вашингтонского университета впервые использовал тандемную масс-спектрометрию, предложив MC/MC- и ВЭЖХ-MC/MC-анализ для массового обследования новорожденных на ряд ЛБН, мультиплексирование которых в 2004 году заложило основу для многих пилотных исследований ЛБН, проведенных позднее [575]. Субстраты, выбранные или синтезированные для этих анализов, структурно ближе к естественным субстратам, чем искусственные флуориметрические субстраты. Этот метод был дополнительно оптимизирован и стандартизован в виде протокола (Кембридж, Массачусетс) в 2008 году [1054]. Изготовленные с использованием стандартов надлежащей производственной практики (GMP) и зарегистрированные в Управлении по контролю за продуктами и лекарствами (FDA) Genzyme Corporation, эти специфичные для анализа реагенты (субстраты, внутренние стандарты и продукты) были изготовлены и распределены в испытательные лаборатории Центров по контролю и профилактике заболеваний (CDC). С тех пор были разработаны и внедрены несколько мультиплексных подходов, наиболее полный из

которых, позволяющий осуществлять одновременную диагностику девяти лизосомных ферментов в одном пятне крови, был также описан профессором Гелбом с коллегами [894].

Успешное применение скрининговых программ по выявлению НБО объясняется комплексным характером используемых диагностических стратегий, подразумевающим разумное сочетание и последовательное использование современных биохимических и молекулярно-генетических методов анализа. Современные успехи в развитии лабораторных диагностических технологий позволили внедрить в практику такие мощные высокопроизводительные системы для проведения массового скрининга, как, например, тандемная масс-спектрометрия и высокопроизводительное секвенирование [782].

Технология МС/МС также позволяет с высокой точностью одновременно определять содержание нескольких десятков аминокислот, ацилкарнитинов и других метаболитов [883]. Эффективность данной технологии позволила включить ее в государственные программы неонатального скрининга новорожденных детей на органические ацидурии, аминокислотопатии и дефекты митохондриального β -окисления жирных кислот в ряде стран [790, 912]. К сожалению, эта технология пока не используется для массового неонатального скрининга в России, хотя оборудование и квалификация научных сотрудников некоторых ведущих многопрофильных медицинских центров нашей страны, включая ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России и ФГБНУ «МГНЦ имени академика Н.П. Бочкова», не уступает зарубежным, что создает необходимые предпосылки для участия в неонатальных скрининговых программах. Во всяком случае, в ряде регионов (например, в Свердловской и Ростовской областях) уже были запущены пилотные проекты по массовому скринингу новорожденных на наследственные нарушения обмена аминокислот и органических кислот с помощью технологии МС/МС [2].

При интерпретации результатов ферментативной диагностики *in vitro* необходимо учитывать, что активность ферментов, измеряемая искусственными субстратами, может не коррелировать напрямую с их активностью *in vivo*, приводя к ложным результатам. К примеру, высокая распространенность псевдодефицитного аллеля *p.G576S* гена *GAA* у китайцев не связана с высокой заболеваемостью болезнью Помпе в Китае, а связана с псевдодефицитом кислой α -глюкозидазы при измерении ее активности синтетическим 4-MU-глюкозидным субстратом в рамках программы скрининга новорожденных на Тайване [556]. Ложные положительные результаты, связанные с наличием аллелей псевдодефицита, могут быть опровергнуты путем тестирования с использованием другого субстрата, либо путем молекулярно-генетического



исследования [1014]. Кроме того, анализы ферментов *in vitro* обычно не учитывают действие других существенных компонентов внутри лизосомы, таких как кофакторы, шапероны и активаторы, необходимых для процессинга и стабилизации структуры фермента, поэтому нормальные значения фермента могут быть ложноотрицательными, не исключая при этом диагноз [1046]. У пациентов с очевидной клинической картиной, при нормальном значении фермента, следует учитывать заболевания, вызванные сопутствующими факторами, активаторами или другими ферментами. Примерами этого являются дефицит активатора GM2, дефицит сапозина В или множественный дефицит сульфатазы, протекающие с клинической картиной, подобной метахроматической лейкодистрофии [1014]. При подозрении на множественный дефицит сульфатазы необходимо проверить несколько сульфатаз перед молекулярно-генетическим анализом гена *SUMF1*, что также не позволяет ограничиваться единственным методом диагностики ЛБН.

Далее более подробно рассмотрены особенности клинической картины, а также современные возможности диагностики и терапии некоторых ЛБН, изученных в настоящей работе.

Группа ЛБН, связанных с генетически обусловленным нарушением расщепления сфинголипидов с суммарной распространенностью 1 случай на 10 000 живых новорожденных [911], в состав которой, согласно МКБ-10, входят GM1-ганглиозидоз, муколипидоз, тип IV, GM2-ганглиозидоз (болезнь Тея–Сакса, болезнь Сандхоффа и А/В вариант), болезни Фабри, Гоше, Краббе, Ниманна–Пика, синдром Фарбера и метахроматическая лейкодистрофия. Сфинголипиды (с греческого *Sphingo* – связывать) – соединения общей формулы $RCH(OH)CH(NHCOR')CH_2OX$, где R – алкил, R' – алкенил. Сфинголипиды включают церамиды (X = H), фосфосфинголипиды (X = P(O)(O⁻)Y), и гликосфинголипиды (X = моно- или олигосахарид) [410]. Сфинголипиды гидролизуются в клетках лизосомными ферментами до церамидов и далее под действием цераминидаз расщепляются на высшие кислоты и сфингозиновые основания (рис. 1).

Биологическая роль сфинголипидов разнообразна. Известно, что они участвуют в формировании мембранных структур аксонов, синапсов и других клеток нервной ткани, опосредуют в организме механизмы узнавания, рецепторные взаимодействия, межклеточные контакты и другие жизненно важные процессы [419, 567, 888, 898].

Клиническая картина заболеваний этой группы обусловлена накоплением сфинголипидов, преимущественно в лизосомах селезенки, печени, легких, головном и спинном мозге, возникающим из-за сниженной каталитической активности гидролаз, кодируемых дефектными генами [539].

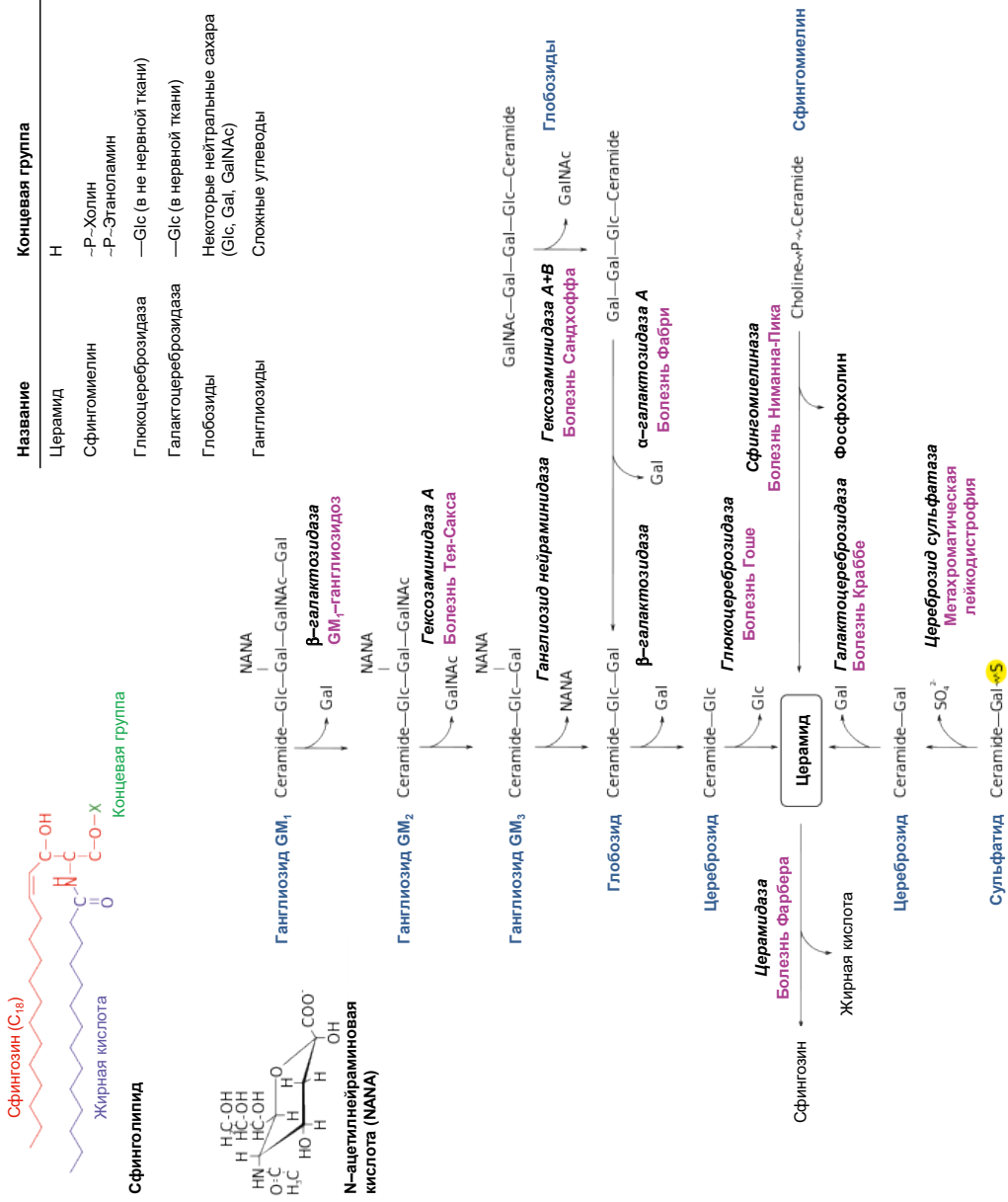


Рис. 1. Метаболизм сфинголипидов



1.1.1. БОЛЕЗНЬ ГОШЕ

Болезнь Гоше (БГ) – редкое наследственное заболевание, возникающее вследствие патогенных изменений гена *GBA*, приводящих к сниженной активности кодируемой им бета-D-глюкоцереброзидазы, вызывая накопление нерасщепленных сфинголипидов в лизосомах мононуклеарных фагоцитов и других лейкоцитов, преимущественно в селезенке, печени и костном мозге. Общая средняя частота БГ составляет 1 случай на 40 000 живых новорожденных [651], при этом распространенность БГ в США составляет 1 случай на 20 000 живых новорожденных [708], в Австралии – 1 случай на 57 000 живых новорожденных [655], в Нидерландах – 1,16 : 100 000 [771]. Чаще всего болезнь поражает евреев ашкенази, встречаясь с частотой 1 случай на 1000 живых новорожденных [539], при этом носителем мутантного аллеля является каждый 16-й представитель этой популяционной группы [407]. Принято считать, что существуют три типа БГ в зависимости от неврологического статуса и возраста манифестации болезни: БГ, тип I (нейронопатический), OMIM 230 800; БГ, тип II (нейронопатический инфантильный), OMIM 230 900; БГ, тип III (нейронопатический ювенильный), OMIM 231 000; и два подтипа БГ: подтип ПС, OMIM 231 005 и перинатально летальный, OMIM 608 013. Мутации, вызывающие БГ, являются рецессивными и наследуются в соответствии с аутосомно-рецессивным типом наследования [695].

БГ была впервые описана французским дерматологом Филиппом Гоше. В 1882 году, будучи студентом, он обнаружил БГ у 34-летней женщины, весившей 31 кг с пятикилограммовой селезенкой, обозначив это состояние термином «спленомегалия» и описав заболевание в своей диссертации как рак селезенки [366]. Кроме того, используя световую микроскопию, он изучил постмортальные клетки, названные позднее клетками Гоше. Ученые сравнивают эти клетки с измятой папиросной бумагой. В 1895 году с похожими клиническими проявлениями был описан шестилетний мальчик. В 1901 году патологоанатом Брилл продемонстрировал, что БГ носит наследственный характер, обнаружив поражение печени, лимфатических узлов и костей у нескольких родственных пациентов и предложил использовать эпоним «болезнь Гоше» для описания этого состояния. В 1920 году впервые была описана нейронопатическая форма БГ (БГ, тип II) с появлением неврологической симптоматики в инфантильном возрасте. И лишь в 1959 году появилось описание БГ, тип III, при котором неврологическая симптоматика у больных манифестировала позднее, чем в БГ, тип II, в ювенильном возрасте [273].

БГ стали относить к лизосомным болезням накопления после ряда открытий, прояснивших патогенез заболевания. Так, в 1934 году французский химик Агион выделил из клеток Гоше и впервые описал глюкоцереброзид [76], благодаря чему стало известно, какой именно гликолипид накапливается в организме. А в 1965 году американский врач О'Брэди продемонстрировал, что глюкоцереброзид накапливается в лизосомах клеток вследствие низкой активности бета-D-глюкоцереброзидазы, неспособной должным образом катализировать его расщепление до церамида и глюкозы [175]. Таким образом, на белковом уровне был описан ферментативный блок, причинами возникновения которого стали патогенные изменения гена *GBA*, клонированного в 1984 году Э. Джинсом с ассистентами [118]. Ген *GBA*, расположенный в хромосомной области 1q21, длиной 7,6 т.п.н., состоит из 11 экзонов и кодирует белок, состоящий из 496 аминокислотных остатков, молекулярной массой 55,4 кДа [892]. В 1989 году Горовитц с соавторами секвенировали псевдоген, гомологичный гену *GBA* на 96% [454], расположенный на 16 т.п.н. за геном *GBA* по направлению к 3'-концу [891].

Основу фенотипических проявлений БГ составляет значительная инфильтрация клетками Гоше селезенки, приводящая к гиперактивности органа, и, как следствие, к снижению количества эритроцитов и последующей анемии. Больные ощущают слабость и быструю утомляемость по причине нехватки кислорода в различных органах и тканях. Эта же гиперактивность приводит и к снижению уровня тромбоцитов в крови, что проявляется в частом образовании гематом, а также частых и обильных носовых кровотечениях. Инфильтрация клетками Гоше зачастую вызывает уменьшение числа лейкоцитов, что приводит к снижению иммунного статуса организма, частым и продолжительным инфекционным болезням. Инфильтрация клетками Гоше печени может приводить к образованию рубцов, циррозу печени и увеличивает вероятность образования камней в желчном пузыре. Накопление клеток Гоше в костном мозге приводит к уменьшению притока крови в костную ткань, нарушению обмена фосфора и кальция, к структурным изменениям костей, напоминающим по форме колбу Эрленмейера [583].

Клиническая картина БГ обладает значительной гетерогенностью, равно как и показатели смертности, в зависимости от типа болезни и даже в рамках одного типа [595]. К примеру, накопление глюкозилцерамида в печени, селезенке, легких и других органах способствует панцитопении, массивной гепатоспленомегалии и, порой, диффузной инфильтрационной легочной болезни, тогда как прогрессирующая инфильтрация клеток Гоше в костном мозге, а также увеличенный синтез цитокинов приводит к утоньшению костей, переломам, болям в костях, костным инфарктам и остеопении у одних пациентов

с БГ, тип I в детском возрасте, и бессимптомному течению болезни – у других, которые могут случайно диагностироваться в возрасте 70 лет и старше при выявлении у них спленомегалии или тромбоцитопении [145]. Зачастую основной причиной инвалидизации пациентов с БГ, тип I и БГ, тип III является поражение костной ткани [695]. У пациентов с БГ и у их гетерозиготных родственников риск развития болезни Паркинсона в 5 раз превышает общепопуляционный [125, 646]. Кроме того, описан повышенный риск развития онкологических болезней, особенно миеломы [937] и деменции с тельцами Леви [700].

БГ, тип II являясь острой нейронопатической формой БГ, менее гетерогенен по возрастному признаку в сравнении с БГ, тип I: клинические проявления в виде повышенного мышечного тонуса и задержки развития возникают в среднем в 3–5 месяцев, позднее развивается косоглазие и судороги, сопровождаясь нарушением дыхательных и глотательных процессов [411]. БГ, тип II характеризуется стремительным нарастанием нейродегенеративных нарушений, регрессом развития, остановкой роста, обширным поражением внутренних органов и смертью в течение первых двух лет жизни. Значительный сдвиг равновесия церамид/глюкозилцерамид в пользу последнего приводит к формированию барьера в эпидермальном слое кожи, вызывая развитие ихтиоза [873]. Прогрессирующая психомоторная дегенерация с вовлечением ствола головного мозга приводит к смерти в результате дыхательной недостаточности [740, 874]. Факторы, запускающие неврологические нарушения, до сих пор до конца не изучены. Считается, что они могут развиваться по причине накопления цитотоксических гликолипидов в клетках мозга вследствие чрезвычайно низких уровней ферментативной активности и нейровоспаления [989].

Перинатально летальная форма БГ была условно выделена в отдельный, наиболее тяжелый подтип БГ, тип II [668]. Младенец рождается живым не позднее 36 недели беременности, при этом для его фенотипа характерно утолщение ихтиозного кожного покрова, гепатоспленомегалия, гипотония, тромбоцитопения, угнетение дыхания, судороги, контрактуры суставов и дисморфия лица. При отсутствии водянки плода младенцы доживают до трехмесячного возраста, с водянкой плода смерть в 90% случаев наступает внутриутробно, либо в первые два дня после преждевременных родов [411, 668].

БГ, тип III является подострой хронической нейронопатической формой БГ с более поздним началом, в возрасте 6–15 лет, и медленным прогрессированием симптоматики по сравнению с БГ, тип II. В большинстве случаев неврологические проявления болезни начинаются с расстройства глазодвигательных функций и окуломоторной апраксии [865]. У некоторых пациентов развивается миоклоническая эпилепсия

[748] и деменция [695]. Двигательные и когнитивные неврологические симптомы развиваются в более позднем возрасте [786]. Некоторые дети испытывают трудности с обучением. Редкая подгруппа пациентов с БГ, тип III, являющаяся генетическим изолятом из северного региона Швеции (Norrbottnian), гомозиготна по мутации *p.L444P* [271]. У этих детей в раннем детстве болезнь сопровождается расстройством глазодвигательных функций, а также висцеральной и скелетной вовлеченностью, в редких случаях развиваются судороги, когнитивные нарушения и слабоумие. Такие больные при своевременно начатом лечении доживают до 30 лет, а в некоторых случаях до 40 лет. Смерть, как правило, наступает в результате несовместимых с жизнью изменений в печени и легких.

Пациенты, больные БГ, тип IIIС, имеют отличительные особенности фенотипа в виде кальцификации аортального и митрального клапанов, а также помутнения роговицы и гомозиготного генотипа *p.D409H/p.D409H* [164].

Для диагностики БГ используются одни и те же методы вне зависимости от типа болезни. Они включают оценку клинической картины болезни, лабораторную и инструментальную диагностику. Увеличение размеров печени и селезенки, в том числе небольшое, граничащее с нормой, выявляется при ультразвуковом обследовании брюшной полости, либо с помощью магнитно-резонансной томографии. На рентгеновских снимках наблюдается утолщение костей в форме колбы Эрленмейера. В клиническом анализе крови прослеживается снижение уровня эритроцитов, тромбоцитов и гемоглобина, в биохимическом – повышение печеночных ферментов АСТ и АЛТ. Золотым стандартом лабораторной диагностики БГ является измерение ферментативной активности бета-D-глюкоцереброзидазы в лейкоцитах крови или фибробластах иммунофлуоресцентным методом, в сухих пятнах крови – с помощью метода тандемной масс-спектрометрии. До появления этих методов диагностики активно использовалась биопсия органов и костной ткани на предмет выявления клеток Гоше. При этом ошибочность этих исследований была велика по причине схожести клеток Гоше с псевдоклетками Гоше, поэтому в настоящее время этот метод диагностики почти не используется. При БГ, тип I значения ферментативной активности могут достигать 30–50% от референсных величин, тогда как для БГ, тип II – не превышают 5%. Кроме этого, вспомогательным маркером развития БГ служит иммунофлуоресцентное измерение хитотриозидазы в крови, активность которой повышается в десятки раз. Этот же маркер используется для контроля проводимой ферментозаместительной терапии БГ. Для выявления первопричины развития БГ чаще всего используется двунаправленное секвенирование кодирующих и прилегающих интронных областей гена *GBA*, результат которого, благодаря изучен-



ным фенотипическим корреляциям, в некоторых случаях помогает спрогнозировать тип болезни до появления определенной клинической симптоматики, а также необходим для проведения пренатальной и преимплантационной диагностики в семьях с отягощенной наследственностью.

К настоящему времени в базе HGMD описано 440 мутаций этого гена, 75% которых составляют миссенс- и нонсенс-мутации, 11% составляют делеции и дупликации, более 6% – мутации, оказывающие влияние на сплайсинг, и около 8% составляют перестройки между геном и псевдогеном [468]. Небольшие внутригенные делеции, инсерции, миссенс-, нонсенс- и сплайсинговые мутации выявляются с помощью метода прямого автоматического секвенирования всех кодирующих и прилегающих интронных областей гена *GBA*, тогда как делеции и дупликации отдельных экзонов и целого гена [142, 266], а также перестройки выявляются как с помощью количественной ПЦР, так и с помощью метода MLPA. Близкое расположение псевдогена вносит дополнительные сложности для диагностики БГ, так как между геном и псевдогеном, как и в случае синдрома Хантера, происходят частичные перестройки, носящие патогенный характер [923]. Кроме того, непатогенные мутации псевдогена могут ошибочно интерпретироваться как патогенные мутации гена *GBA*. К настоящему времени для этого заболевания описаны 2 частые мутации: *p.N409S*, *p.L483P*, составляющие в среднем от 50 до 60% всех мутаций гена, с которых зачастую и начинается молекулярно-генетическая диагностика БГ. При этом наиболее частой мутацией гена *GBA* считается мутация *p.N409S*, встречающаяся у евреев ашкенази с частотой до 70% [453, 872] и с частотой 22–54% в других популяциях [86, 259, 665, 955, 998]. Для БГ описаны фенотипические корреляции, характерные для различных подтипов болезни, например, генотип *p.N409S/p.N409S* характерен для БГ, тип I с мягким течением и поздним началом [455], генотип *p.L483P/p.L483P* – для БГ, тип II и III [391], тогда как генотип *p.D409H/p.D409H* – для пациентов с БГ, тип IIIС [164]. Однако гетерогенность клинических проявлений у пациентов с БГ весьма значительна и зачастую не может быть полностью объяснена лишь патогенными изменениями нуклеотидной последовательности гена *GBA*, так как тяжесть БГ может быть различной даже между сибсами, имеющими одинаковые генотипы [87]. Аналогичным образом, количество остаточной ферментативной активности не позволяет точно предсказать тип БГ и ее тяжесть.

До появления ФЗТ пациентам с БГ было рекомендовано проведение спленэктомии, однако после появления ФЗТ удалять увеличенную селезенку продолжили лишь в редких случаях, так как эта процедура приводила к значительному накоплению клеток Гоше в печени, что само

по себе представляло большую опасность для организма больного [970]. Первым препаратом для ФЗТ БГ была Alglucerase (Цередаза), полученная из плацентарной ткани человека, а затем модифицированная ферментативно [286]. Препарат прошел одобрение FDA в 1991 году [1033], позднее был снят с продажи после появления нескольких аналогичных препаратов [75, 329], последним из которых стал одобренный в 2014 году Cerdelga (Элиглулат) производства компании Genzyme. Клинические исследования показали, что ФЗТ способна остановить развитие БГ, тип I и приостановить развитие БГ, тип III за исключением неврологических повреждений, при этом показана прямая зависимость наилучшего результата ФЗТ от ее раннего начала [397, 458], поэтому особую значимость имеет своевременная постановка клинического диагноза, следующая за результатами лабораторной диагностики.

Раннее выявление пациентов с БГ посредством биохимической и генетической диагностики, а также измерение уровня гликозилсфингозина (лизо-Гл1) позволяет поставить правильный диагноз, способствует своевременному назначению ФЗТ, а также контролю за ней и ее коррекции, поэтому в рамках проводимого нами исследования особое внимание было уделено разработке и внедрению методов измерения активности β -D-глюкоцереброзидазы и концентрации лизо-Гл1 в сухих пятнах крови для оптимизации пересылки и хранения биоматериала, а также для повышения эффективности диагностики БГ и контроля проводимой патогенетической терапии. В рамках данной научной работы ставилась задача оптимизировать алгоритм ранней диагностики БГ при помощи биохимической и молекулярно-генетической диагностики, а также изучить относительные частоты и спектр выявленных мутаций, обнаруженных нами в результате селективного скрининга детей с подозрением на БГ, а также пациентов, диагноз которым был поставлен ранее, описав при этом особенности их фенотипа.

1.1.1.1. Селективный скрининг болезни Гоше у российских пациентов

Селективный скрининг БГ проводился среди 7210 (3419 мужчин и 3791 женщина) пациентов из групп высокого риска. Всем пациентам в возрасте от 3 месяцев до 62 лет с подозрением на БГ проводилось биохимическое измерение активности бета-D-глюкоцереброзидазы в пятнах крови, высушенных на фильтровальной бумаге, методом МС/МС на тандемном масс-спектрометре Брукер, а также концентрации биомаркера лизо-Гл1 в сухих пятнах крови методом ВЭЖХ-МС/МС, при этом у 2286 (31,7%) пациентов концентрация лизо-Гл1 измерялась ретроспективно.

В результате проведенного скрининга сниженная активность фермента была выявлена у 70 пациентов из 7210 исследованных, тогда как завышенные концентрации лизо-Гл1 были обнаружены у 68 пациентов. Всем пациентам со сниженной активностью фермента было проведено молекулярно-генетическое исследование, в результате чего у 68 (0,94%) пациентов был подтвержден лабораторный диагноз БГ, посредством обнаружения высокой концентрации биомаркера лизо-Гл1 и выявления патогенных изменений референсной последовательности гена *GBA*. Необходимо заметить, что у двух пациентов значения активности бета-D-глюкоцереброзидазы были в пределах референсных, тогда как концентрации лизо-Гл1 были завышены. Молекулярно-генетическая диагностика обоих пациентов позволила в одном случае выявить гетерозиготный вариант *c.667T>C*, описанный ранее [244], тогда как второй пациент являлся носителем гетерозиготного варианта *c.1226A>G*, также описанного ранее [363].

Согласно полученным данным, были рассчитаны чувствительность и специфичность метода определения активности бета-D-глюкоцереброзидазы. При используемой отрезной точке 1,85 мкмоль/л/ч чувствительность метода составила (100%), а специфичность (99,0%). В результате проведенного ROC-анализа была скорректирована оптимальная отрезная точка для определения активности бета-D-глюкоцереброзидазы. Новое значение отрезной точки составило 1,79 мкмоль/л/ч, что соответствовало чувствительности 100% и позволило увеличить специфичность до 99,5% за счет переноса значения ферментативной активности пациента, показавшего ложноположительный результат в группу истинно отрицательных (рис. 2).

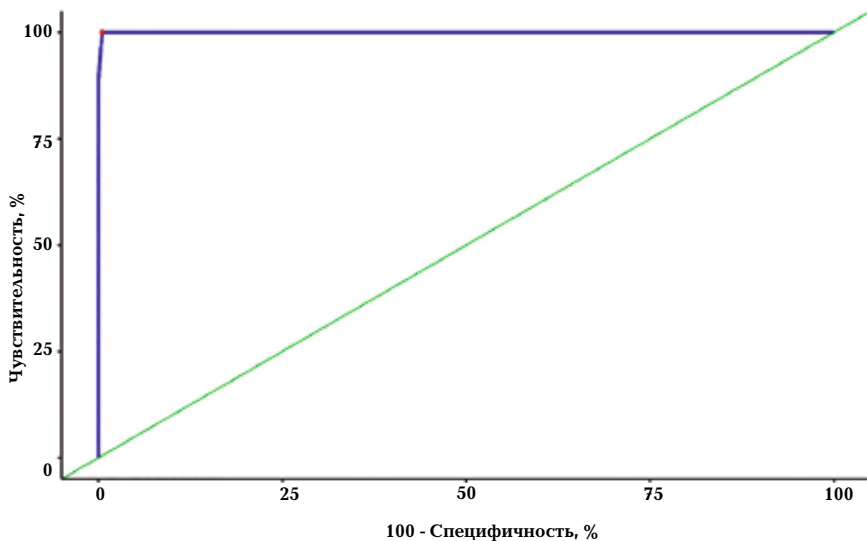


Рис. 2. ROC-кривая метода определения активности бета-D-глюкоцереброзидазы

Значение отрезной точки для лизо-Гл1 после проведения скрининга было оставлено на прежнем уровне 12,78 нг/мл. Это значение соответствовало максимальным показателям чувствительности (100%) и специфичности (100%) для определения концентрации этого анализата. Интервал значений концентрации лизо-Гл1 у всех 68 пациентов с БГ лежал выше и не перекрывался со значением концентрации этого анализата в группе контроля.

1.1.1.2. Клинические, географические и генетические особенности болезни Гоше

Благодаря осуществленному скринингу и молекулярно-генетической диагностике 259 пациентов с БГ, сниженная ферментативная активность которых была выявлена ранее, нами была проведена оценка клинико-лабораторных, географических, возрастных и генетических особенностей развития БГ в РФ посредством обследования 327 пациентов (139 (42,5%) мужчин и 188 (57,5%) женщин) из 299 неродственных семей, населяющих 68 субъектов РФ. Средний возраст выборки составил 34,9 лет (стандартное отклонение 18,5 лет), медиана 35,5 лет (от 2 до 68 лет) на момент проведения исследования. Основные клинические, инструментальные и лабораторные особенности удалось описать лишь у пациентов детского возраста с БГ на момент постановки диагноза [3, 37, 38]. Клинические особенности БГ были представлены спленомегалией (95%), гепатомегалией (87%), анемией (85%), тромбоцитопенией (74%), астеническим синдромом (54%), геморрагическим синдромом (45%), поражением костно-суставной системы (21%), задержкой физического развития (16%), поражением ЦНС (13%) и спленэктомией (7%) (рис. 3).

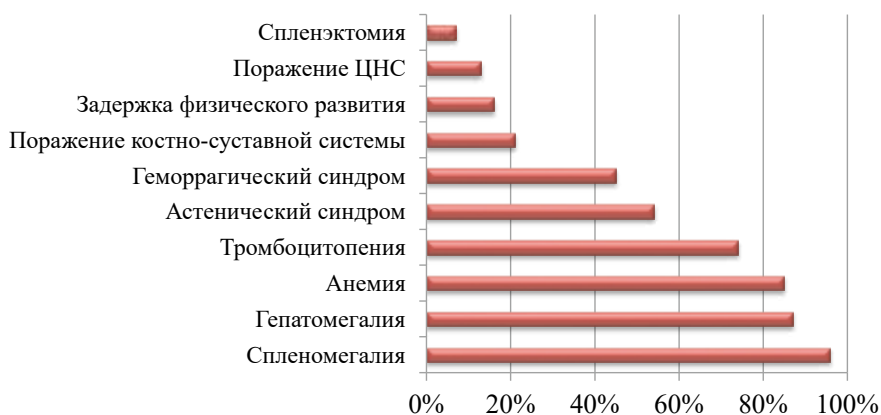


Рис. 3. Частоты основных клинических и лабораторных особенностей БГ у 116 российских детей

Географические особенности БГ удалось определить у 308 (94,2%) пациентов с мутациями гена *GBA* из 293 (98,0%) неродственных семей с БГ (табл. 1).

Таблица 1. Распределение обследованных нами пациентов с БГ в различных субъектах РФ

Субъект	Численность населения	Число семей	Число случаев	Частота в субъекте*
Москва	12 615 882	32	32	1:394 246
Республика Башкортостан	4 051 005	12	13	1:311 616
Челябинская область	3 475 727	11	12	1:289 644
Ханты-Мансийский АО	1 663 798	6	10	1:166 380
Красноярский край	2 874 050	9	9	1:319 339
Санкт-Петербург	5 383 968	8	8	1:672 996
Ставропольский край	2 795 103	8	8	1:349 388
Московская область (МО)	7 599 756	8	8	1:949 970
Саратовская область	2 440 729	7	8	1:305 091
Пермский край	2 610 800	7	7	1:372 971
Краснодарский край	5 648 254	7	7	1:806 893
Республика Крым и Севастополь	2 355 027	7	7	1:336 432
Республика Дагестан	3 085 738	6	7	1:440 820
Свердловская область	4 315 702	6	7	1:616 529
Иркутская область	2 397 832	5	7	1:342 547
Нижегородская область	3 214 657	6	6	1:535 776
Оренбургская область	1 963 007	6	6	1:327 168
Калужская область	1 009 377	6	6	1:168 230
Республика Татарстан	3 898 700	5	6	1:649 783
Чеченская Республика	1 456 951	5	6	1:242 825
Астраханская область	1 014 065	5	6	1:169 011
Приморский край	1 902 719	5	5	1:380 543
Самарская область	3 183 038	5	5	1:636 608
Новосибирская область	2 793 389	5	5	1:558 678
Белгородская область	1 547 418	5	5	1:309 484
Ярославская область	1 259 612	5	5	1:251 922
Волгоградская область	2 507 488	5	5	1:501 498
Республика Мордовия	795 502	4	4	1:198 876
Удмуртская Республика	1 507 390	4	4	1:376 848
Владимирская область	1 365 825	4	4	1:341 456
Воронежская область	2 327 843	4	4	1:581 961
Липецкая область	1 144 055	4	4	1:286 014

Продолжение таблицы 1

Субъект	Численность населения	Число семей	Число случаев	Частота в субъекте*
Тверская область	1 269 650	4	4	1:317 413
Тульская область	1 478 814	4	4	1:369 704
Ульяновская область	1 238 424	3	3	1:412 808
Кабардино-Балкарская Республика	866 310	3	3	1:288 770
Алтайский край	2 332 511	3	3	1:777 504
Омская область	1 944 225	3	3	1:648 075
Республика Хакасия	536 167	3	3	1:178 722
Томская область	1 077 442	3	3	1:359 147
Орловская область	739 465	3	3	1:246 488
Ростовская область	4 202 337	3	3	1:1 400 779
Забайкальский край	1 065 785	2	2	1:532 893
Сахалинская область	489 638	2	2	1:244 819
Пензенская область	1 318 122	2	2	1:659 061
Чувашская Республика	1 223 395	2	2	1:611 698
Архангельская область	1 144 119	2	2	1:572 060
Ленинградская область	1 813 816	2	2	1:906 908
Мурманская область	748 078	2	2	1:374 039
Кемеровская область	2 674 283	2	2	1:1 337 142
Курганская область	834 718	2	2	1:417 359
Ямало-Ненецкий АО	541 479	2	2	1:270 740
Брянская область	1 200 228	2	2	1:600 114
Ивановская область	1 004 192	2	2	1:502 096
Тамбовская область	1 015 981	2	2	1:507 990
Республика Ингушетия	497 393	1	2	1:248 697
Амурская область	793 194	1	1	1:793 194
Камчатский край	314 722	1	1	1:314 722
Республика Бурятия	983 276	1	1	1:983 276
Республика Саха (Якутия)	966 997	1	1	1:966 997
Кировская область	1 272 133	1	1	1:1 272 133
Республика Марий Эл	680 397	1	1	1:680 397
Вологодская область	1 167 719	1	1	1:1 167 719
Карачаево-Черкесская Республика	465 563	1	1	1:465 563
Республика Тыва	324 420	1	1	1:324 420
Тюменская область	3 723 984	1	1	1:3 723 984
Смоленская область	942 363	1	1	1:942 363
Республика Адыгея	454 762	1	1	1:454 762

Примечание. *На основе выборки пациентов, обследованных в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.



Все изученные случаи пациентов с БГ распределились в 68 (79,0%) субъектах РФ с преобладанием в Москве (32/10,4%). В Республике Башкортостан, Челябинской области и Ханты-Мансийском автономном округе было описано 13 (4,2%), 12 (3,9%) и 10 (3,3%) случаев БГ соответственно. В каждом из остальных субъектов РФ проживают менее 3% из числа обследованных нами пациентов. Обращает на себя внимание значительная встречаемость пациентов с БГ в Калужской, Астраханской областях и ХМАО. На 1 009 377, 1 014 065 и 1 663 798 человек приходится по 6, 6 и 10 обследованных пациентов, составляя наибольшую частоту БГ в нашем исследовании в пересчете на душу населения: 1 : 168 230, 1:169 011 и 1:166379 соответственно.

Анализ географических данных на уровне федеральных округов продемонстрировал, что половина всех обследованных нами пациентов проживают в Центральном (86/27,9%) и Приволжском федеральных округах (68/22,1%). В Сибирском федеральном округе проживают 36 (11,7%) пациентов из 33 (11,4%) семей, в Уральском федеральном округе – 34 (11,0%) пациента из 28 (9,6%) семей. В каждом из остальных федеральных округов проживают менее 10% обследованных нами пациентов. Наибольшая частота БГ среди обследованных нами пациентов в пересчете на душу населения зафиксирована в Уральском федеральном округе и составляет 1 : 363 239 (табл. 2).

Таблица 2. Распределение обследованных нами пациентов с БГ в различных федеральных округах

Федеральный округ	Численность населения	Число семей	Число пациентов	Частота в округе
Центральный	39 378 947	86	86	1:457 895
Приволжский	29 397 227	65	68	1:432 312
Сибирский	17 173 185	34	36	1:477 033
Уральский	12 350 131	28	34	1:363 239
Южный	16 454 580	28	29	1:567 399
Северо-Кавказский	9 866 370	24	27	1:365 421
Северо-Западный	13 972 061	15	15	1:931 471
Дальневосточный	8 188 594	13	13	1:629 892

Примечание. *На основе выборки пациентов, обследованных в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

Для оценки относительных частот и спектра мутаций, характерных для граждан, населяющих территорию РФ, ДНК 327 пациентов с БГ была подвергнута молекулярно-генетическому исследованию, основная сложность которого состояла в близком расположении псевдогена, гомологичного на 96% гену *GBA* [454]. Специально разработанный алгоритм диагностики позволил избавиться от ошибочного анализа последовательностей псевдогена путем двухступенчатой амплификации. На первом этапе амплифицировались кодирующие и некодирующие последовательности нуклеотидов гена *GBA* с помощью технологии лонг-рэндж ПЦР, после чего реамплифицировались и секвенировались кодирующие последовательности этого же гена по отдельности. Проведенное исследование позволило выявить 69 различных патогенных вариантов гена *GBA*, при этом у 23 (7,0%) пациентов было обнаружено лишь по одной гетерозиготной мутации, что заставило нас продолжить исследование методом мультиплексной лигазной амплификации для поиска протяженных делеций, вставок и перестроек между геном и псевдогеном. Для всех выявленных вариантов гена *GBA* были рассчитаны относительные частоты.

Наиболее распространенной мутацией среди обследованных пациентов является мутация *c.1226A>G*, *p.N409S*, встретившаяся на 308 (47,1%) поврежденных хромосомах, у 251 (76,8%) пациента из 243 семей (81,3%). Эта мутация также чаще других встречается в европейских, американских и ближневосточных когортах пациентов с БГ и гораздо реже у китайских и японских пациентов [455]. Второй по относительной частоте является мутация *c.1448T>C*, *p.L483P*, идентифицированная на 125 (19,1%) поврежденных хромосомах у 105 (32,1%) пациентов из 99 (33,1%) семей. Эта мутация также является частым патогенным вариантом гена *GBA* и в других популяциях [297, 363], при этом в российской популяции она встречается немного реже, чем в большинстве других, что может быть связано как с популяционной особенностью, так и с недообследованностью тяжелых случаев БГ в РФ. Кроме того, необходимо учитывать, что многие лаборатории не идентифицируют рекомбинантные аллели, включающие эту мутацию, что также может ошибочно увеличивать процент этой мутации как таковой [455]. Третьей по относительной частоте встречаемости является мутация *c.667T>C*, *p.R223W*, выявленная на 39 (6,0%) поврежденных хромосомах у 39 (11,9%) пациентов из 38 (12,7%) семей. В подавляющем большинстве случаев (36/92,3%) эта мутация выявлена нами в компаунд гетерозиготном состоянии с мутацией *c.1226A>G*, *p.N409S*, при этом около половины семей с этим генотипом проживают в южной части Приволжского федерального округа, особенно в Башкирии (пять семей) и Татарстане (четыре семьи), что может свидетельствовать о преиму-

щественном накоплении мутации *c.667T>C*, *p.W223R* среди популяций, населяющих низовья Волги и Южный Урал. Кроме того, как сама мутация, так и генотип *p.W223R/p.N409S* встречается лишь у пациентов с БГ, тип I, диагностированных в среднем возрасте около 26 лет (медиана 22 года, стандартное отклонение 19 лет) и обладающих в большинстве случаев мягким фенотипом БГ. Остальные варианты гена *GBA* встретились в нашем исследовании с долями, не превышающими 2% (рис. 4).

Все три варианта гена *GBA*, описанные выше, можно считать характерными для популяций, населяющих территорию России [831]. Тогда как мутации *c.84dup*, *p.L29Afs*18* и *c.115+1G>A*, характерные для других популяций, таких как евреи ашкенази [540], в нашем исследовании встречались крайне редко: у трех и двух пациентов соответственно, что может свидетельствовать о существенных межпопуляционных различиях для пациентов с БГ.

В общей сложности удалось обнаружить 77 различных патогенных вариантов гена *GBA*, что составляет пятую часть (20,5%) от 376 мутаций, описанных в базе данных HGMD на момент проведения исследования, при этом девять из них приходится на различные протяженные делеции, дубликации и рекомбинации между геном и псевдогеном. Подавляющее большинство обнаруженных вариантов являются миссенс-мутациями (50/64,9%). Они были выявлены у всех 327 обследованных нами пациентов в различных состояниях. Миссенс-мутации преобладают и в других крупномасштабных молекулярно-генетических исследованиях, проведенных к настоящему времени, при этом их доли и спектр сильно варьируют в различных географических регионах [455, 540].

Рекомбинации между геном и псевдогеном, а также протяженные делеции и вставки встретились у 23 (7,0%) пациентов в гетерозиготном состоянии, составляя 11,7% разных типов мутаций. Различия в спектре и относительных частотах перестроек между геном и псевдогеном также значительны и в других странах, к примеру, наиболее распространенный рекомбинантный аллель *RecNciI* достигает доли 21% среди всех патогенных аллелей, обнаруженных у пациентов из Аргентины [260], при этом все рекомбинации встречаются с долями, не превышающими 3% у евреев ашкенази, 6% у корейцев, и достигают 24% сразу в нескольких странах [497].

Нонсенс-мутации были выявлены у 11 (3,7%) пациентов в гетерозиготном состоянии, составляя 10,4%.

Делеции и дубликации, приводящие к сдвигу рамки считывания, встретились у 7 (2,1%) пациентов, тогда как делеция и вставки/делеции, не сдвигающие рамку считывания, встретились у 8 (2,5%) пациентов, составляя в совокупности 10,4% различных типов мутаций.

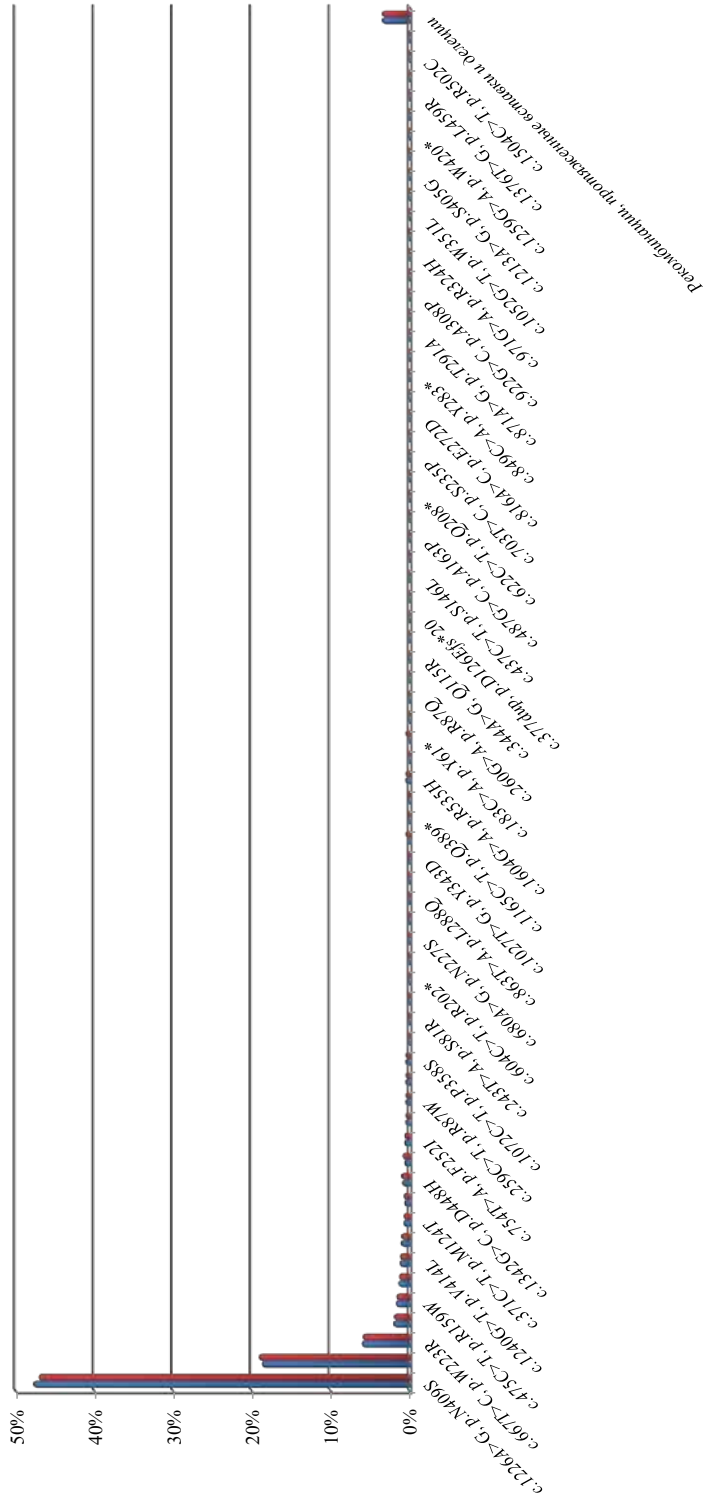


Рис. 4. Относительные частоты и спектр различных вариантов гена GBA, выявленных у 327 российских пациентов с БГ из 311 семей (красные столбцы характеризуют доли различных мутаций среди 327 пациентов с БГ, синие столбцы характеризуют доли различных мутаций в 311 семьях с БГ)



Мутации, приводящие к нарушению сайта сплайсинга, были обнаружены лишь у 3 (0,9%) пациентов (рис. 5).



Рис. 5. Доли различных типов мутаций, выявленных у 327 российских пациентов с БГ

1.1.1.3. Описание новых патогенных вариантов гена *GBA*

Такое разнообразие различных патогенных вариантов гена *GBA* в совокупности с 26/77 (33,8%) (рис. 6) не описанными ранее мутациями свидетельствует о значительном генетическом разнообразии популяционных групп, населяющих территорию РФ, как по географическому, так и по национальному признаку и пополняет число известных к настоящему времени патогенных вариантов гена *GBA*, приведенных в базе данных HGMD на момент окончания исследования, на 6,9%.

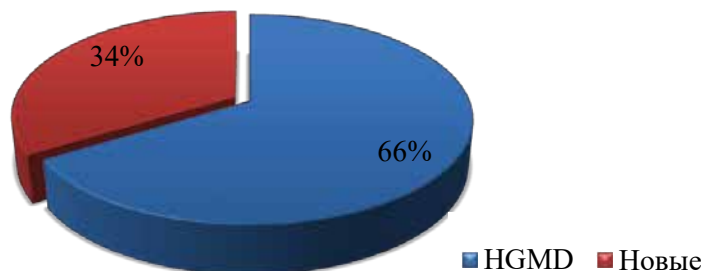


Рис. 6. Соотношение мутаций гена *GBA*, описанных и не описанных ранее в международной базе данных HGMD

Среди не описанных ранее патогенных вариантов гена *GBA*, приводящих к развитию БГ, 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). Кроме того, 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). Необходимо отметить, что делеция *c.334_338del*, *p.E112Vfs*32* имеет описание в базе данных HGMD, однако это описание не связано с БГ [CD151841]. Новые мутации были обнаружены у 42 (12,8%) пациентов с БГ из 37 (11,9%) семей, при этом *c.1157T>G*, *p.F386C* была обнаружена у 5 пациентов из четырех семей, 2 из которых проживают в Чувашии, 2 – в Башкортостане, и 1 – в Челябинской области (близкое географическое положение может указывать на эффект основателя); *c.474_485del*, *p.I158_P161del* – у 6 пациентов из четырех семей из различных регионов, *c.1039A>T*, *p.I347F* – у 3 пациентов из двух семей; *c.1027T>G*, *p.Y343D*; *c.243T>A*, *p.S81R*; *c.732C>A*, *p.Y244**; каждая из которых была обнаружена в двух семьях у 2 пациентов, *c.183C>A*, *p.Y61** – в одной семье у 2 братьев и сестры, остальные новые мутации гена *GBA* были обнаружены единожды.

1.1.1.4. Генотип-фенотипические корреляции

Из 327 обследованных нами пациентов у 3 (0,9%) детей был поставлен диагноз БГ, тип II, у 21 (6,4%) пациента был поставлен диагноз БГ, тип III, у остальных 303 (92,7%) – БГ, тип I. Несмотря на зна-



чительный объем накопившихся генетических данных, способность делать прогностические предсказания на их основе весьма ограничена. Перечисление отдельных мутаций, встречающихся у пациентов с БГ различных типов, имеет сомнительную значимость, так как лишь комбинация обоих аллелей определяет фенотип в каждом конкретном случае. Это означает, что для выявления фенотипических корреляций имеет смысл сравнивать клиническую картину пациентов с одинаковыми гомозиготными мутациями либо одинаковыми комбинациями гетерозиготных мутаций. Подавляющее большинство описанных к настоящему времени мутаций гена *GBA* обнаружено у пациентов с различными типами БГ [144, 540, 874], при этом классификация пациентов по одному из трех типов в некоторых случаях затруднительна. К примеру, в настоящей работе изучены случаи БГ, протекавшие в младенчестве и детстве без неврологических признаков, в связи с чем были отнесены к БГ, тип I, однако развитие неврологических признаков впоследствии привело к реклассификации детей как пациентов с БГ, тип III, что также встречается в зарубежной литературе [146, 878]. Кроме того, в литературе описаны пациенты, которые попадают в промежуточный диапазон между классическим фенотипом БГ, тип II и БГ, тип III [392].

Пациенты со сходными фенотипами имеют различные генотипы даже в уникальных популяционных подгруппах и, наоборот, пациенты с одним генотипом могут обладать различающимися фенотипами и ответами на терапию. Значительные различия клинической картины болезни были выявлены нами среди братьев и сестер с не описанной ранее делецией *p.Ile158_Pro161del*, что коррелирует с зарубежными описаниями больных сибсов, в том числе близнецов [87, 557]. Клиническая картина 40 обследованных нами пациентов с БГ, тип I и генотипом *c.1226A>G/c.1226A>G* варьируется от значительной органомегалии, задержки роста и болезни костей у детей до почти бессимптомного фенотипа у взрослых. Достоверная ассоциация была получена для обладателей этого аллеля с БГ, тип I ($p<0,001$) (табл. 3), что было описано ранее [806, 1002].

Таблица 3. Расчет ассоциации аллеля *c.1226A>G* гена *GBA* с развитием БГ, тип I

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

Обзор пациентов с генотипом *c.1448T>C/c.1448T>C* также демонстрирует значительный клинический полиморфизм обследованных нами детей в диапазоне от летального исхода в младенчестве до успешного обучения в старших классах школы, что также перекликается с зарубежными данными [391]. При этом патогенный вариант *c.1448T>C* достоверно ассоциирован с БГ, тип III ($p<0,001$) (табл. 4). Генотип *c.1448T>C/c.1448T>C* был и ранее ассоциирован с нейронопатическими формами БГ [79].

Таблица 4. Расчет ассоциации генотипа *c.1448T>C/c.1448T>C* гена *GVA* с развитием БГ, тип III

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

Кроме того, удалось обнаружить достоверные корреляции генотипа *c.1448T>C/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 генотипа *c.1226A>G/c.1226A>G* – с наиболее поздним возрастом постановки диагноза (медиана 26,5 (13,5–44,5)) ($p<0,001$) среди российских пациентов с мажорными генотипами гена *GVA* (табл. 5).

Таблица 5. Расчет корреляции (р-значение (U-критерий Манна–Уитни)) возрастных характеристик пациентов с мажорными генотипами

Возраст	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

Примечание. В таблице 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%).



Измерение концентрации биомаркера лизо-Гл1 не позволило выявить достоверные корреляции ни с носительством наиболее частых мутаций *c.1226A>G* ($p=0,626$) и *c.1448T>C* ($p=0,623$), ни с различными типами БГ ($p=0,96$). При этом удалось выявить достоверные различия в медианных значениях концентрации лизо-Гл1 у пациентов с БГ до проведения ФЗТ и через 12 месяцев с начала проведения ФЗТ ($p<0,001$) (табл. 6), что подтверждает данные иностранных коллег о том, что этот биомаркер может использоваться в качестве мониторинга проводимой ФЗТ [694].

Таблица 6. Расчет достоверности различий в значениях концентрации лизо-Гл1 до проведения ФЗТ и через 12 месяцев после первого введения препарата

Проведение ФЗТ	Число пациентов	Концентрация лизо-Гл1, нг/мл	р-значение (критерий Уилкоксона)
До ФЗТ	84	230,4 (96,2–477,1)	<0,001
Во время ФЗТ	47	140,3 (58,2–281,9)	

Примечание. Концентрации лизо-Гл1 представлены значениями медианы и квартилями распределения признаков (25–75%).

Зарубежные авторы отмечают ассоциацию мутаций *p.L483P* и/или *p.R502C* с БГ, тип III и с висцеральными нарушениями, тогда как мутации *p.N221S*, *p.G410S* и *p.V433L* преимущественно ассоциированы с БГ, тип III и с миоклонической эпилепсией [546, 748]. Кроме того, в литературе существует несколько описаний атипичного фенотипа, который включает кальцификацию или фиброз сердечных клапанов, помутнения роговицы, гидроцефалию и дисморфические особенности, специфически связанные с гомозиготной мутацией *p.D448H* [68, 214]. При этом компаунд-гетерозиготы *p.D448H/p.H255Q* ассоциированы с БГ, тип II [666]. Однако нам не удалось обнаружить данные ассоциации, что может свидетельствовать в пользу предположения о том, что с пациентами, обладающими редкими аллелями или аллелями, ассоциированными ранее с различными фенотипами, следует проявлять осторожность при прогнозировании тяжести заболевания.

1.1.1.5. Оптимизация алгоритма генетической диагностики болезни Гоше

Мутации *c.1226A>G*, *c.1448T>C* и *c.667T>C*, суммарная доля которых составляет 72,2%, позволяют оптимизировать алгоритм молеку-

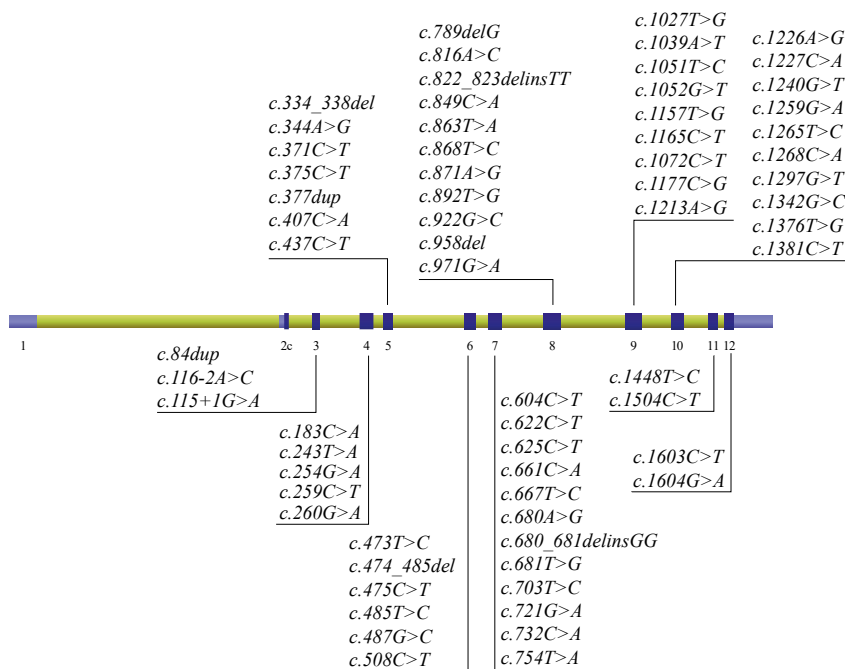


Рис. 7. Структура гена *GBA* (NM_001005741.2) и распределение мутаций, выявленных в ходе проведенного исследования

лярно-генетической диагностики БГ для российских пациентов, начиная с диагностики этих вариантов методом ПЦР в режиме реального времени. Кроме того, после расчета доли всех мутаций, обнаруженных в экзонах 7, 10 и 11 гена *GBA* (рис. 7), стало очевидно, что секвенирование этих экзонов методом Сэнгера может увеличить вероятность выявления мутаций у российских пациентов до 81,5%.

Наибольшее разнообразие вариантов (12/19%) было выявлено в экзоне 7, тогда как в экзоне 2с не было найдено ни одной мутации (см. рис. 7).

Ложноположительное значение ферментативной активности, полученное в результате проведенного исследования, а также сложность выявления перестроек между геном и псевдогеном позволяют рекомендовать измерение концентрации биомаркера лизо-Гл1 в качестве теста первого уровня для диагностики БГ у российских пациентов [832].

На основании анализа данных, полученных в ходе проведенного исследования БГ у российских пациентов, может быть предложен следующий алгоритм генетической диагностики БГ:

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

2) в случае концентрации лизо-Гл1, превышающей отрезную точку, – измерение ферментативной активности β -D-глюкоцереброзидазы и поиск мажорных мутаций *c.1226A>G*, *c.1448T>C* и *c.667T>C* гена *GBA* с использованием лонг-рэндж ПЦР;

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

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.

1.1.1.6. Выводы

Разработанные методы тандемной масс-спектрометрии и молекулярно-генетического исследования позволили провести скрининговое обследование 7210 пациентов с подозрением на БГ, выявить 68 (0,94%) пациентов с БГ и предложить измерение концентрации биомаркера лизо-Гл1 в качестве первого этапа нового алгоритма диагностики БГ, а также в качестве биомаркера, применяющегося для мониторинга БГ у российских пациентов. 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, пополнив базу HGMD 26 новыми мутациями, что составляет 6,7% всех описанных в ней патогенных вариантов гена *GBA*, вызывающих развитие БГ. 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 отличительной 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 гомозиготного патогенного варианта *c.1448T>C*, с БГ, тип III ($p<0,001$) и патогенного варианта *c.1226A>G* с БГ, тип I ($p<0,001$), а также достоверные корреляции биаллельной мутации *c.1448T>C* с наиболее ранним возрастом манифестации болезни (медиана 0,7 (0,4–1)) и поста-

новки диагноза (медиана 1,3 (1–2,1)) ($p < 0,001$), а биаллельной мутации *c.1226A>G* – с наиболее поздним возрастом манифестации болезни ($p < 0,001$) среди мажорных мутаций гена *GBA*, обнаруженных нами у российских пациентов.

1.1.2. БОЛЕЗНЬ ФАБРИ

Болезнь Фабри (БФ), OMIM 301500 – редкое наследственное заболевание, причиной развития которого служат мутации гена *GLA*, приводящие к сниженной активности кодируемой им α -галактозидазы А и, как следствие, к накоплению токсических гликофинголипидов в различных органах и тканях организма [703]. Средняя частота встречаемости БФ оценивается как 1 случай на 40 000 живых новорожденных мальчиков [655]. В некоторых популяциях частота встречаемости БФ, описанная среди диализных больных, составляет 1 случай на 1000 пациентов мужского пола [545]; среди больных с идиопатической кардиомиопатией – 1 случай на 30 пациентов мужского пола [820]; среди больных с инсультами криптогенной природы – 1 случай на 20 пациентов мужского пола и 1 случай на 40 пациентов женского пола [807]. В общей сложности БФ встречается в 8,8% случаев среди контингента пациентов, страдающих НБО [881] и является вторым по частоте ЛБН после БГ [607].

Заболевание связано с именем немецкого дерматолога Йоханнеса Фабри, описавшего в 1898 году дерматологические особенности заболевания у 13-летнего мальчика и назвавшего наблюдаемое состояние «узловатой геморрагической пурпурой» [322]. Британский хирург Уильям Андерсен, независимо от Й. Фабри, описывал прогрессирование этого же состояния у пациента с 19-летнего возраста в течение 20 лет [90], вследствие чего некоторые ученые называют описываемое состояние болезнью Андерсена–Фабри.

В основе патогенеза БФ лежат патогенные изменения нуклеотидной последовательности гена *GLA*, расположенного в хромосомной области Xq22. Ген *GLA* имеет длину 12 т.п.н. и состоит из 7 экзонов [154]. Мутации наследуются по сцепленному с полом типу. В связи со случайной инактивацией (лайонизацией) X-хромосомы и отсутствием перекрестной коррекции [352], патогенное действие одних и тех же мутаций может приводить к различному фенотипу у разных носительниц мутаций: от полного отсутствия симптомов болезни, либо мягкой формы болезни, вплоть до тяжелых клинических признаков, сопоставимых с течением болезни у мужчин [302]. В отличие от других X-сцепленных болезней, таких как болезнь Хантера, среди женщин-носительниц мутаций не много тех, у которых отсутствуют

какие-либо проявления БФ [1003], при этом лишь у 70% женщин, имеющих мутации, выставляется клинический диагноз [839].

Патогенность мутаций оценивается организмом на биохимическом уровне посредством сниженной ферментативной активности кодируемого белка α -галактозидазы А, состоящего из 398 аминокислотных остатков, молекулярной массой 45,3 кДа [154], впервые описанной в 1970 году в исследованиях Kint с соавторами, обнаружившими дефицит фермента в лейкоцитах крови [523]. В 1991 году Kirkilionis с соавторами впервые продемонстрировали нецелесообразность измерений ферментативной активности у женщин, выявив снижение фермента в лейкоцитах лишь у 6 женщин из 17 подтвержденных с помощью молекулярно-генетических методов исследования [524].

В 2006 году в Италии была предпринята попытка массового неонатального скрининга на БФ 37 104 новорожденных мальчиков, в результате которой снижение ферментативной активности α -галактозидазы А было выявлено у 12 младенцев в пятнах сухой крови, при этом было доказано, что лишь у 1 ребенка из 11 болезнь манифестирует в раннем возрасте [895].

Недостаточная ферментативная активность α -галактозидазы А приводит к накоплению гликофинголипидов, в частности глоботриаозилцерамида (Гб3 или Гл3), преимущественно в лизосомах клеток стенок мелких кровеносных сосудов, спинальных и вегетативных ганглий, почечных клубочков, трубчатых эпителиальных клеток и кардиомиоцитов, вызывая системные нарушения, характеризующиеся хронической болью и акропарестезиями, снижением слуха, гипогидрозом, желудочно-кишечными расстройствами, помутнением роговицы, ангиокератомами, прогрессирующей почечной недостаточностью, кардиомиопатией, гипертрофией левого желудочка, дисфункцией клапанного аппарата сердца и инсультом [250]. Гб3 и его изоформы обнаруживаются в крови пациентов с БФ с начала 2000-х годов [671], однако лишь в 2008 году Aerts с соавторами впервые удалось описать значительное накопление деацилированного метаболита Гб3 в лизосомах клеток, именуемого глоботриаозилсфингозин (лизо-Гб3) [74], продемонстрировавшего более высокую чувствительность по сравнению с Гб3 и прекрасную корреляцию с фенотипом БФ [885]. Ранее этого сделать не удавалось по причине высокой гидрофильности соединения, что требовало разработки методов, обладающих высокой чувствительностью. Эти исследования позволили прояснить некоторые механизмы патогенеза БФ, включая неполную пенетрантность у женщин, а также сделали лизо-Гб3 надежным биомаркером БФ, измерение концентрации которого помогает поставить диагноз в большинстве спорных случаев, а также принять своевременное решение о назначении ФЗТ при

постановке лабораторного диагноза до появления первых клинических проявлений болезни [447]. Кроме того, измерение уровней накапливающихся гликофинголипидов позволяет контролировать эффективность проводимой патогенетической терапии [74].

За 46 лет с момента первой работы по измерению активности α -галактозидазы А фундаментальная наука претерпела существенные изменения, особенно в области молекулярно-генетической диагностики, однако до сих пор не изобрела ни одного универсального метода диагностики БФ, который можно считать достоверным в 100% случаев. Поэтому считается, что диагностику БФ необходимо начинать с измерения активности α -галактозидазы А в лейкоцитах, либо в сухих пятнах крови, то есть с биохимических методов, которые позволяют в короткие временные интервалы провести исследования сотням пациентов. А в качестве подтверждающих методов исследования использовать более трудоемкую и дорогостоящую молекулярно-генетическую диагностику для пациентов, продемонстрировавших сниженную ферментативную активность.

В 2009 году Waldek и соавторы проанализировали регистр больных БФ, насчитывающий к тому времени 2848 пациентов, и выяснили, что средний возраст манифестации БФ у мужчин составляет 24 года, а у женщин – 33 года, при этом средняя продолжительность жизни больных мужчин составила 58,2 года, а женщин – 75,4 года, вместо 74,7 и 80 лет соответственно в основной популяции США. Самой частой причиной ранней смерти оказались болезни сердца и сосудов [997]. Детальный анализ выживаемости на фоне патогенетической терапии не проводился. Среди педиатрического контингента средний возраст манифестации болезни у мальчиков составляет 6–8 лет, у девочек – 9 лет, тогда как основными клиническими признаками БФ для этой возрастной категории являются острые и эпизодические болевые кризы, с последующими хроническими акропарестезиями [32, 450]. Осложнения БФ, угрожающие жизни, в педиатрическом возрасте наблюдаются крайне редко. В исследовании Mehta и соавторов, использовавших информацию о 1453 пациентах с БФ из 19 стран, сообщалось, что неврологические признаки были описаны у 75% мужчин и 61% женщин, почечная недостаточность – у 19% мужчин и 3% женщин, сердечно-сосудистые проявления наблюдались у 60% мужчин и 50% женщин, при этом у 40% мужчин и 24% женщин выявлялась гипертрофия левого желудочка, у 9% мужчин и 5% женщин – инсульт. Кроме того, сообщалось, что наиболее частой причиной смерти после 2001 года являлись сердечно-сосудистые осложнения, тогда как до 2001 года – почечная недостаточность у мужчин и заболевания сосудов головного мозга



у женщин, что свидетельствует об успехах в борьбе с болезнями почек у пациентов с БФ в последние годы [652].

Многообразие клинических проявлений БФ, возраст манифестации и течение заболевания определяются многими этиологическими факторами патогенеза, при этом основополагающим фактором, запускающим патологический процесс, является патогенное изменение референсной последовательности гена *GLA*. Анализ мутаций гена *GLA*, попытки выявить корреляции генотипа и фенотипа помогают объяснить особенности БФ, связанные с преимущественным поражением той или иной системы как при классической форме БФ, так и при атипичных формах с поздней манифестацией и вовлеченностью одной из систем [699]. Среди описанных к 2003 году патогенных вариантов гена *GLA*, 45% мутаций, приводящих к классическому фенотипу БФ, являлись нонсенс-мутациями, то есть мутациями, приводящими к преждевременной терминации трансляции [902]. К настоящему времени в базе HGMD описано 845 патогенных вариантов гена *GLA*, 589 (70%) из которых являются миссенс/нонсенс-мутациями, 42 (5%) мутации приводят к нарушению сплайсинга, 165 (19,5%) – небольших делеций / инсерций и 49 (5,5%) крупных делеций / инсерций, структурных перестроек и мутаций, затрагивающих регуляторные области. Кроме того, описаны 3 патогенных варианта, расположенных глубоко в интронных областях гена *GLA* [470]. Скрининг новорожденных на Тайване показал высокую распространенность одного из таких вариантов *IVS4+919G>A* (~1 : 1600 мужчин) среди пожилых членов семьи с поздними сердечными проявлениями [582]. Особый интерес представляет нуклеотидная замена *c.937G>T* (*p.D313Y*), патогенность которой носит противоречивый характер, однако большинство специалистов придерживаются мнения, что это так называемый псевдодефицитный аллель, в некоторых случаях снижающий уровень активности α -галактозидазы А в плазме крови [347, 607]. Вывод об отсутствии патогенности рассматриваемого псевдодефицитного аллеля сделан на основании высокой частоты встречаемости гемизиготного аллеля среди здоровых индивидов: 1 случай из 660 обследованных [1042]. Однако есть исследования, в которых показано, что гемизиготное носительство этого нуклеотидного варианта приводит к клиническим проявлениям БФ [319].

Практически все осложнения БФ являются неспецифическими по своей природе и клинически неотличимы от аналогичных нарушений, которые происходят в контексте других расстройств в общей популяции. Это значительно затрудняет клиническую диагностику БФ [839]. Своевременная диагностика БФ является важной задачей современной медицины еще и по причине того, что для лечения БФ разработана успешно применяемая ФЗТ. ФЗТ с внутривенными

инфузиями α -галактозидазы А постепенно уменьшает уровень лизо-Гб3 в плазме крови, очищая от лизосомных включений эндотелиальные клетки сосудов, при этом действие ФЗТ на другие ткани не столь очевидно [808], поэтому раннее начало ФЗТ считается максимально эффективным, тем более что некоторые осложнения являются необратимыми вне зависимости от концентрации вводимого внутривенно препарата [149]. Воздействие ФЗТ на пациентов с атипичной формой БФ редко исследуется отдельно, фокусируясь на специфических признаках, например, фиброзе сердца или тяжелой почечной недостаточности, способных снизить эффективность ФЗТ, поскольку наличие таких признаков указывает на необратимое повреждение органов [1012].

В настоящее время в РФ зарегистрированы два орфанных препарата для проведения ФЗТ: агалсидаза- α (Replagal[®]), производства компании Шайер, и агалсидаза-бета (Fabrazyme[®]), производства компании Джензайм. При прямом сравнительном исследовании обоих ферментов не было показано превосходства или большей эффективности одного из них, так же как и нежелательное побочное действие этих препаратов на организм человека не имело существенных различий [983].

Кроме того, в последнее время в качестве терапии БФ активно разрабатываются и тестируются малые молекулы, определяемые как фармакологические шапероны, которые планируется применять персонализированно, в зависимости от выявленной у пациента мутации [248]. К примеру, иминосакхар, известный под разными названиями: 1-дезоксигалактоноджиримицин (DGJ), мигаластат, AMIGAL. DGJ может использоваться как в синергии с ФЗТ, так и отдельно [1008, 1040]. При пероральном введении дозой 150 мг он хорошо переносится, повышает активность α -галактозидазы А и уменьшает концентрацию лизо-Гб3 в плазме крови у большинства пациентов с миссенс-мутациями гена *GLA* [377].

Профилактика БФ, как и любого другого наследственного заболевания, сводится к профилактике случаев повторного возникновения БФ в отягощенных семьях методами пренатальной и преимплантационной диагностики, донорством гамет. Особую настороженность следует проявлять при пересадке донорской почки, диагностируя всех доноров на БФ, особенно если донорами являются члены семьи пациента с БФ.

Раннее выявление пациентов с БФ посредством ферментативной и генетической диагностики, а также измерение уровня лизо-Гб3 позволяет поставить правильный диагноз, способствует своевременному назначению ФЗТ и ее мониторингу, поэтому в рамках проводимого нами исследования особое внимание было уделено разработке и внедрению методов измерения активности α -галактозидазы А и концентрации

лизо-Гб3 в сухих пятнах крови для оптимизации пересылки и хранения биоматериала, а также для повышения эффективности диагностики БФ и контроля проводимой патогенетической терапии.

1.1.2.1. Селективный скрининг болезни Фабри у российских пациентов

Селективный скрининг БФ проводился среди 15 009 (13 037 мужчин и 1972 женщины) пациентов из групп высокого риска [702], находящихся на гемодиализном лечении [678], пациентов из неврологических и кардиологических отделений, в том числе пациентов с ранними инсультами.

Всем мужчинам в возрасте от 14 до 68 лет проводилось измерение ферментативной активности α -галактозидазы А методом МС/МС и концентрации лизо-Гб3 в сухих пятнах крови методом ВЭЖХ-МС/МС, при этом у 3725 (28,6%) пациентов концентрация лизо-Гб3 измерялась ретроспективно.

После проведения селективного скрининга сниженная активность фермента была выявлена у 38 (0,3%) мужчин из 13 037 исследованных. Повышенную концентрацию биомаркера лизо-Гб3 удалось обнаружить у 37 (0,27%) из них. Лабораторный диагноз был подтвержден при помощи молекулярно-генетической диагностики, в результате которой у 37 пациентов были обнаружены гемизиготные варианты гена *GLA*. Необходимо отметить, что при определении активности α -галактозидазы А был выявлен один ложноотрицательный и два ложноположительных результата. Ложноотрицательная ферментативная активность была выявлена у мужчины с концентрацией лизо-Гб3, составляющей 8,58 нг/мл, и мутацией *c.758T>C* гена *GLA*, описанной ранее у пациентов с атипичным течением БФ [606]. Тогда как ложноположительные значения ферментативной активности были обнаружены у двух мужчин с нормальной концентрацией лизо-Гб3 и с вариантами *c.427G>A* и *c.937G>T* гена *GLA*, преимущественно описанными у пациентов без клинических проявлений БФ.

Согласно полученным данным, были пересчитаны чувствительность и специфичность метода определения активности α -галактозидазы А. При выбранной отрезной точке определения активности α -галактозидазы А 1,89 мкмоль/л/ч чувствительность метода составляла 97,3%, а специфичность 96,0%. В результате проведенного ROC-анализа была скорректирована оптимальная отрезная точка для определения активности α -галактозидазы А. Новое значение отрезной точки составило 1,81 мкмоль/л/ч, что соответствовало чувствительности 97,3% и позволило увеличить специфичность до 99,5% за счет пере-

носа значения ферментативной активности пациента, показавшего ложноположительный результат в группу истинно отрицательных (рис. 8).

Значение отрезной точки для лизо-Гб3 после проведения скрининга было оставлено на прежнем уровне 1,91 нг/мл (приложение Д, рис. 113). Это значение соответствовало максимальным показателям чувствительности (100%) и специфичности (100%) для определения концентрации этого анализата у мужчин. Значения концентрации лизо-Гб3 у всех 37 пациентов мужского пола лежали выше и не перекрывались со значениями концентрации этого анализата в группе контроля.

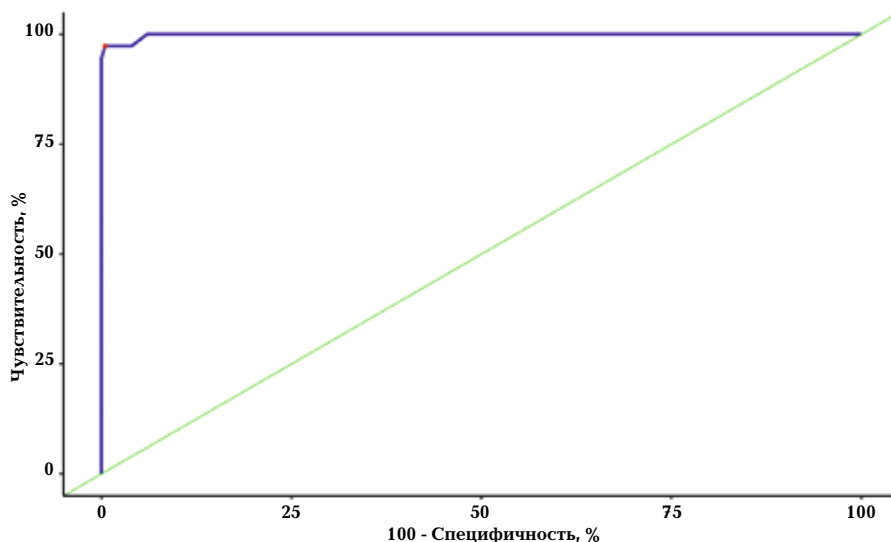


Рис. 8. ROC-кривая метода определения активности α -галактозидазы А у мужчин

Скринируемые женщины не подвергались ферментативной диагностике ввиду высоковероятного пропуска пациентов с БФ (приложение Б, рис. 106). Всем 1972 женщинам в возрасте от 19 до 76 лет проводилось секвенирование кодирующих и прилегающих интронных областей гена *GLA*, а также измерение концентрации лизо-Гб3 в крови методом ВЭЖХ-МС/МС, причем у 533 (27%) женщин эту концентрацию измеряли ретроспективно.

В результате генетической диагностики изменение референсной последовательности нуклеотидов гена *GLA* было обнаружено у 24 женщин, тогда как повышенные концентрации биомаркера лизо-Гб3 были выявлены лишь у четырех из них. У 19 женщин с нормальными значениями концентрации лизо-Гб3 были выявлены нуклеотидные вари-

анты, описанные ранее, как варианты с противоречивой патогенностью и незначительным снижением ферментативной активности: *c.247G>A*, *c.376A>G* и *c.937G>T* [572, 607]. Кроме того, необходимо отметить, что у одной женщины с БФ и патогенным вариантом *c.1211G>A* гена *GLA* [701] значение концентрации лизо-Гб3 было ложноотрицательным и составляло 0,80 нг/мл. Таким образом, в результате скрининга женщин с подозрением на БФ было выявлено 5 (0,25%) пациентов.

Согласно полученным значениям концентрации лизо-Гб3 у женщин в результате селективного скрининга была определена чувствительность и специфичность метода. При отрезной точке 1,91 нг/мл чувствительность метода определения лизо-Гб3 у женщин составила 80,0%, а специфичность 100%. При этом чувствительность метода секвенирования по Сэнгеру составила 100%, а специфичность – 99,0%. Использование секвенирования по Сэнгеру с последующим измерением концентрации лизо-Гб3 у пациентов с выявленными вариантами гена *GLA* позволяет повысить эффективность диагностики БФ у российских женщин.

Таким образом, в результате селективного скрининга 15 009 пациентов из групп высокого риска было выявлено 42 (0,27%) случая БФ среди неродственных пациентов, что в целом соответствует подобным исследованиям, проведенным за рубежом [964].

1.1.2.2. Клинические, географические и генетические особенности болезни Фабри

Оценка географических и молекулярно-генетических особенностей развития БФ в РФ была проведена с помощью обследования 162 пациентов с различными вариантами гена *GLA* (86 мужчин и 76 женщин) из 77 неродственных семей, населяющих 32 (37,2%) субъекта РФ. Важно отметить, что семейный анализ 106 пациентов позволил обнаружить 74 пациента с различными вариантами гена *GLA*, у 48 из которых не было информации о клинических проявлениях, либо клинические проявления отсутствовали, поэтому расчет корреляций проводился у 114 пациентов с БФ. В возрасте до 18 лет было выявлено 37 (22,6%) пациентов: 28 мальчиков и 9 девочек, в среднем возрасте 11 лет и 6 месяцев, медиана 12 лет на момент проведения исследования. Необходимо отметить, что процентное содержание пациентов, не достигших 18 лет, превышало процентное содержание детей (от общего числа описанных), состоящих в европейском регистре (15,0%) [789], что, по всей видимости, связано с педиатрической направленностью ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России. При этом медианный возраст диагностики БФ у 51 ребенка из того же

регистра, включающего пациентов из 11 европейских стран, составляет приблизительно 10 лет, отличаясь от возраста появления первых симптомов на 3 года [789]. Вероятно, что более поздний медианный возраст постановки диагноза у российских детей может быть связан с недавним началом программ селективного скрининга БФ в России и низкой настороженностью врачей в отдаленных регионах нашей страны, связанной с отсутствием знаний и опыта в этой области.

Клинические особенности БФ удалось описать у 20 детей (13 мальчиков и 7 девочек), обследованных в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России (рис. 9).



Рис. 9. Частоты клинических проявлений БФ у обследованных нами детей в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

Наиболее частым проявлением классической формы БФ, манифестировавшей в возрасте от 5 до 11 лет (медиана 7 лет у мальчиков и 9 лет у девочек) среди обследованных нами детей, явилась нейропатическая боль (58,0%), протеинурия выявилась у 47,0% детей, ангиокератомы – у 37,0%, пониженное потоотделение обнаружилось также у 37,0% пациентов, абдомиалгия и/или диарея – у 21,0%, кератопатия – у 17,0%, гипертрофия левого желудочка и/или боли в сердце, а также тиннит и/или снижение слуха – у 5,0% детей. Интересно, что гендерные особенности, возраст манифестации и фенотип детей с БФ, описанный ранее, имел схожее распределение клинических проявлений [309], однако наше исследование выявило больший процент протеинурии и меньший процент кератопатии у детей с БФ, что может быть связано с популяционными особенностями.

Географические особенности БФ удалось установить для 124 (76,5%) пациентов с мутациями гена *GLA* из 62 (80,5%) неродственных семей,отягощенных БФ (табл. 7).

Таблица 7. Распределение обследованных нами пациентов с мутациями гена *GLA* в различных субъектах РФ

Субъект	Численность населения	Число семей	Число пациентов	Частота в субъекте*
Москва	12 615 882	8	14	1:901134
Нижегородская область	3 214 657	4	13	1:247281
Свердловская область	4 315 702	6	12	1:359642
Ульяновская область	1 238 424	3	9	1:137603
Красноярский край	2 874 050	3	7	1:410859
Новосибирская область	2 793 389	2	5	1:558 678
Тамбовская область	1 015 981	1	5	1:203 196
Санкт-Петербург	5 383 968	4	4	1:1 345 992
Оренбургская область	1 963 007	3	4	1:490 752
Иркутская область	2 397 832	2	4	1:599 458
Забайкальский край	1 065 785	1	4	1:266 446
Орловская область	739 465	1	4	1:184 866
Смоленская область	942 363	1	4	1:235 591
Белгородская область	1 547 418	1	4	1:386 855
Ростовская область	4 202 337	3	4	1:1 050 584
Московская область	7 599 756	3	3	1:2 533 252
Чеченская Республика	1 456 951	1	3	1:485 650
Республика Северная Осетия – Алания	699 312	1	3	1:233 104
Самарская область	3 183 038	1	2	1:1 591 519
Приморский край	1 902 719	1	2	1:951 360
Волгоградская область	2 507 488	1	2	1:1 253 744
Курская область	1 107 041	1	2	1:553 521
Ставропольский край	2 795 103	1	1	1:2 759 103
Республика Башкирия	4 051 005	1	1	1:4 051 005
Удмуртская Республика	1 507 390	1	1	1:1 507 390
Астраханская область	1 014 065	1	1	1:1 014 065
Республика Крым и Севастополь	2 355 027	1	1	1:2 355 027
Мурманская область	748 078	1	1	1:748 078
Пермский край	2 610 800	1	1	1:2 610 800
Республика Дагестан	3 085 738	1	1	1:3 085 738
Амурская область	793 194	1	1	1:793 194
Вологодская область	1 167 719	1	1	1:1 167 719

Примечание. *На основе выборки пациентов, обследованных в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

Все выявленные случаи пациентов с мутациями гена *GLA* распределились в 32 (37,2%) субъектах РФ с преобладанием в Москве (14/11,3%), Нижегородской (13/10,5%) и Свердловской (12/9,7%) областях. Значительный процент выявляемых случаев в этих трех субъектах РФ указывает на высокую частоту наследования патогенных вариантов гена *GLA* в отягощенных семьях. В Москве пациенты с мутациями гена *GLA* были обнаружены в восьми семьях, в Свердловской области – в шести семьях, а в Нижегородской области – в четырех. В Санкт-Петербурге также удалось обнаружить пациентов с мутациями гена *GLA* в четырех семьях, не состоящих между собой в родстве. В остальных регионах пациенты с мутациями гена *GLA* встретились с долями менее 10%. Наибольшая частота встречаемости пациентов с мутациями гена *GLA* в пересчете на душу населения зафиксирована в Ульяновской области: 1 случай на 137 603 человека.

При переходе на уровень федеральных округов становится очевидным, что более половины всех обследованных пациентов проживают в Центральном федеральном округе (36/29,0%) и Приволжском федеральном округе (31/25,0%). В Сибирском федеральном округе проживают 20 (16,1%) пациентов, в каждом из остальных федеральных округов – менее 10% обследованных нами пациентов с мутациями гена *GLA*. При этом наибольшее число семей с мутациями гена *GLA* зафиксировано в Центральном федеральном округе (20/32,3%) и Уральском федеральном округе (10/16,1%), а наибольшая частота в пересчете на душу населения – в Сибирском федеральном округе: 1 случай на 858 659 (табл. 8).

Таблица 8. Распределение обследованных нами пациентов с мутациями гена *GLA* в различных федеральных округах

Федеральный округ	Численность населения	Число семей	Число пациентов	Частота в округе*
Центральный	39 378 947	20	36	1:1 093 860
Приволжский	29 397 227	6	31	1:948 298
Сибирский	17 173 185	7	20	1:858 659
Уральский	12 350 131	10	12	1:1 029 178
Южный	16 454 580	6	8	1:2 056 823
Северо-Кавказский	9 866 370	4	8	1:1 233 296
Северо-Западный	13 972 061	6	6	1:2 328 677
Дальневосточный	8 188 594	3	3	1:2 729 531

Примечание. *На основе выборки пациентов, обследованных в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

Для оценки относительных частот и спектра мутаций, характерных для российских пациентов, было проведено молекулярно-генетическое исследование таргетных областей гена *GLA* у 162 обследованных пациентов из 77 семей, в результате которого было обнаружено 63 различных варианта, что составляет 7% вариантов, описанных в международной базе данных HGMD на момент проведения исследования. Для всех выявленных вариантов гена *GLA* были рассчитаны относительные частоты, кроме того, доли мутаций удалось рассчитать и в неродственных семьях (рис. 10).

Большинство вариантов гена *GLA*, выявленных нами, специфичны для единичных семей, что в целом является характерной чертой X-сцепленных болезней, и БФ в частности [279]. Лишь 11 (17,5%) мутаций гена *GLA* выявлены в двух и более семьях с БФ, тогда как каждая из остальных мутаций была обнаружена у членов одной семьи. Наиболее частой мутацией гена *GLA* среди обследованных семей оказалась нонсенс-мутация *c.679C>T*, приводящая к образованию стоп-кодона *p.R227**, обнаруженная в четырех (5,2%) неродственных семьях у 9 (5,6%) пациентов и описанная ранее у пациентов с классической формой БФ [276]. Второй по частоте встречаемости оказалась нонсенс-мутация *c.658C>T*, также приводящая к образованию стоп-кодона *p.R220**, выявленная в трех (3,9%) неродственных семьях у 5 (3,1%) пациентов и описанная ранее также у пациентов с классическим течением БФ [649]. Каждая из следующих миссенс-мутаций: *c.680G>A*, *p.R227Q*; *c.644A>G*, *p.N215S*; *c.161T>C*, *p.L54P*; *c.717A>G*, *p.I239M*; *c.128G>T*, *p.G43V*; *c.1021G>A*, *p.E341K*; *c.1228A>G*, *p.T410A*, а также каждая из нонсенс-мутаций: *c.901C>T*, *p.R301** и *c.1134T>A*, *p.C378** – были обнаружены в двух (2,6%) семьях. Остальные варианты гена *GLA* были выявлены в единичных семьях. Наибольшей долей среди обследованных нами пациентов обладает миссенс-мутация *c.680G>A*, *p.R227Q*, описанная ранее как у пациентов с классической формой БФ [607], так и у пациентов с атипичной сердечной формой БФ [349] и встретившаяся у 11 (6,8%) пациентов. Немного реже встречается нонсенс-мутация *c.1156C>T*, *p.Q386**, обнаруженная у 9 (5,6%) пациентов из трех родственных семей, проживающих в одной деревне, расположенной в Нижегородской области (рис. 11).

Наибольшее число пациентов с патогенными вариантами гена *GLA*, обнаруженное среди родственников, составило девять человек, при этом у 29 неродственных пациентов не было выявлено ни одного родственника с теми же мутациями.

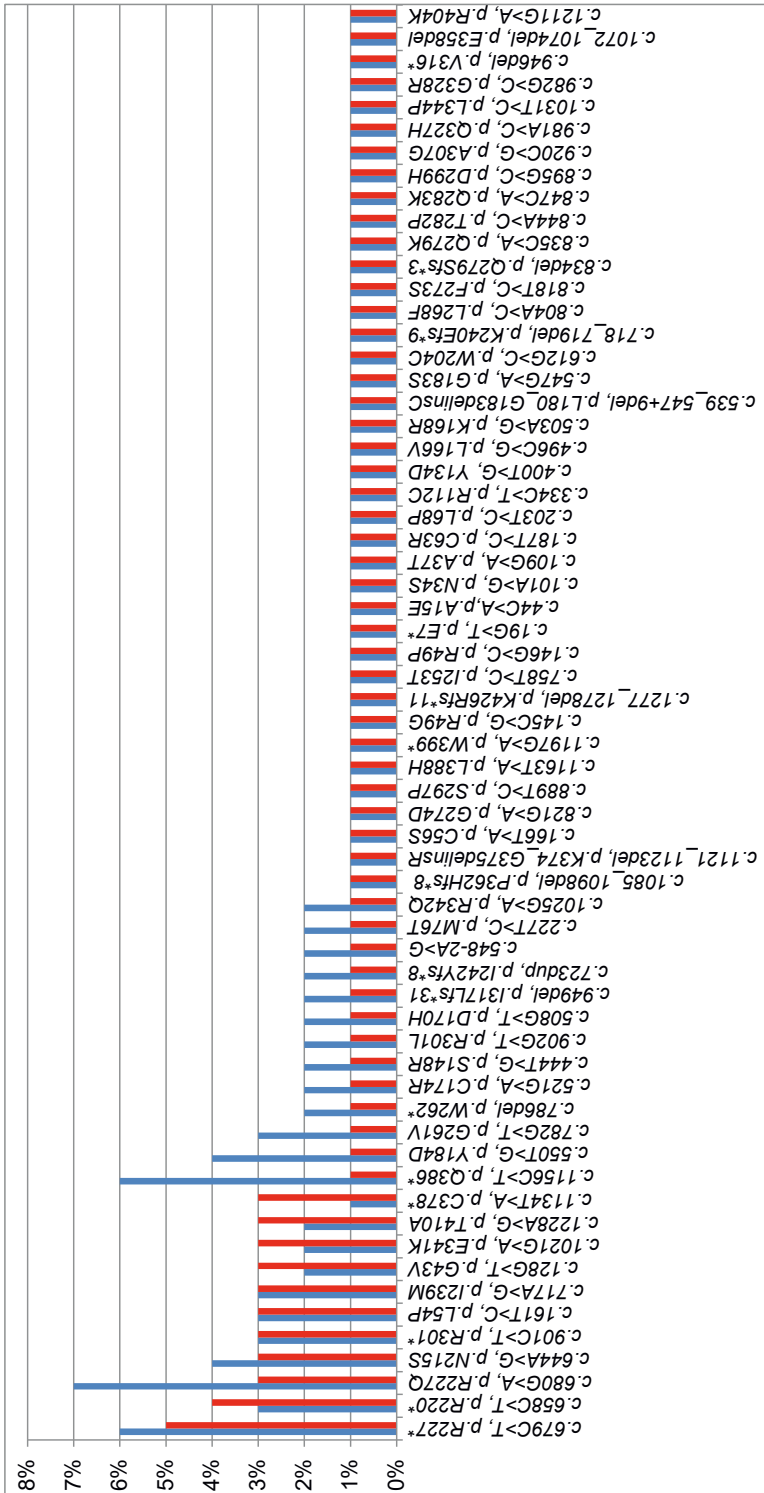


Рис. 10. Относительные частоты и спектр различных вариантов гена *GLA*, выявленных среди обследованных российских пациентов (синие столбцы соответствуют относительным частотам различных вариантов гена *GLA*, выявленных у 162 обследованных пациентов; красные столбцы соответствуют относительным частотам различных вариантов гена *GLA*, выявленных в 77 неродственных семьях)



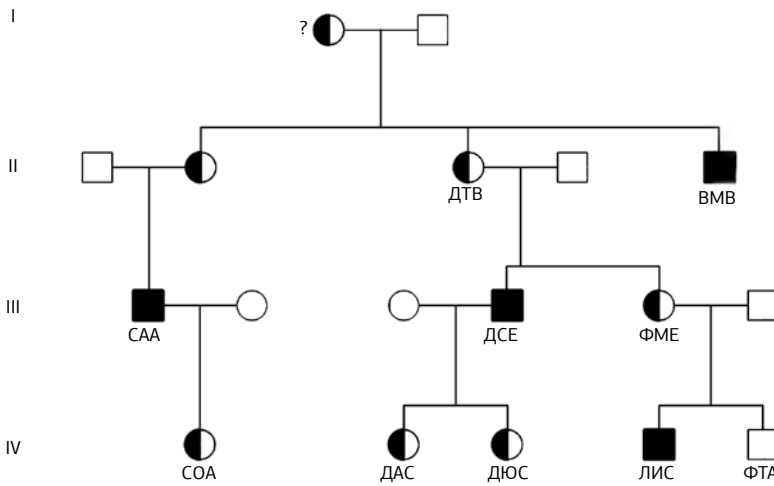


Рис. 11. Родословная семьи, отягощенной БФ, вызванной мутацией $c.1156C>T, p.Q386^*$ гена *GLA*

Среди всех найденных вариантов гена *GLA* значительно преобладают миссенс-мутации (44/69,8%), выявленные у 105 (65,4%) обследованных пациентов. 11 (17,5%) различных вариантов вставок и делеций удалось выявить у 16 (14,8%) пациентов; 7 (11,1%) вариантов нонсенс-мутаций выявлено среди 38 (21,0%) пациентов. Единственная мутация, приводящая к нарушению сайта сплайсинга, была выявлена лишь в одной семье с БФ у 3 (1,9%) пациентов (рис. 12).

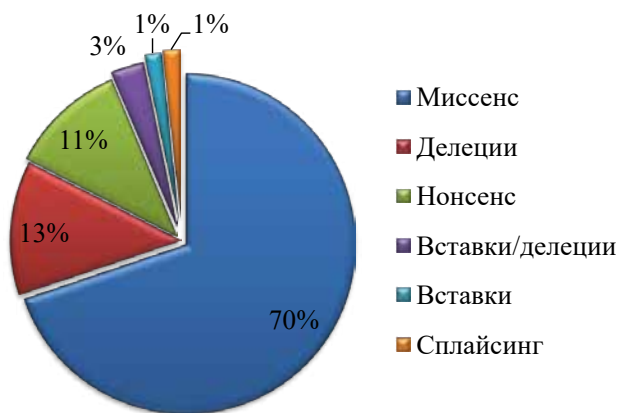


Рис. 12. Доли различных типов мутаций гена *GLA*, выявленных у российских пациентов

1.1.2.3. Описание новых патогенных вариантов гена *GLA*

В результате проведенного исследования выявлено 24 (38,1%) патогенных варианта гена *GLA*, не описанные ранее в базе данных HGMD, среди которых 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) (рис. 13).

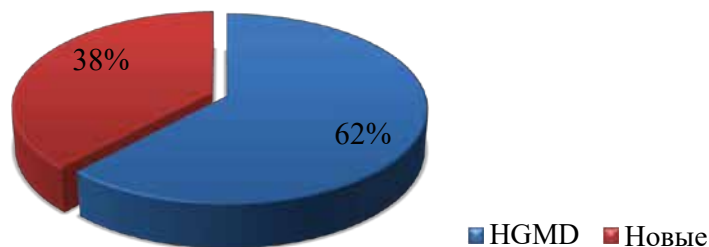


Рис. 13. Соотношение новых мутаций и мутаций, описанных ранее в базе данных HGMD

Все новые мутации были выявлены в единичных российских семьях с БФ, что может подтверждать общемировую тенденцию, а также указывать на значительную вариабельность и недообследованность граждан РФ. Клинические особенности течения БФ у 20 пациентов с не описанными в базе HGMD мутациями приведены в табл. 9.

Таблица 9. Клинические характеристики пациентов с патогенными вариантами гена *GLA*, не описанными ранее

Нуклеотидный вариант	Аминокислотный вариант	Пол	Возраст диагностики, лет	Лизо-Гб3, нг/мл	Кератопатия	Гипогидроз	Акропарестезии	Ангиокератомы	ГЛЖ, боли в груди	Инсульт	Протеинурия/ микроальбуминурия	тХПН (диализ/ трансплантация)	Тугоухость	Абдомиалгии / рвота / диарея	Частые бронхиты
c.166T>A	p.S56S	м	55,0	49,0	н/д	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-
c.187T>C	p.S63R	м	30,0	н/д	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
c.203T>C	p.L68P	м	52,0	н/д	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-
c.400T>G	Y134D	м	37,0	н/д	н/д	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
c.508G>T	p.D170N	м	44,0	н/д	н/д	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
c.521G>A	p.C174Y	м	18,0	н/д	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
c.539_547+9del	p.L180_G183delinsC	м	27,0	15,0	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
c.786del	p.W262*	м	33,0	29,2	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
c.804A>C	p.L268F	м	19,0	75,9	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
c.821G>A	p.G274D	м	27,0	19,6	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+
c.844A>C	p.T282P	м	30,0	17,3	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-
c.889T>C	p.S297P	м	37,0	25,2	н/д	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-
c.895G>C	p.D299N	м	68,0	9,95	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	+	+	-	-	-
c.902G>T	p.R301L	ж	22,0	2,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
c.981A>C	p.Q327H	ж	13,0	6,0	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
c.1163T>A	p.L388H	м	18,0	н/д	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
c.1197G>A	p.W399*	м	43,0	116,0	н/д	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
c.949del	p.I317L/fs*31	м	21,0	60,2	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-
c.1134T>A	p.S378*	м	28,0	73,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
c.1211G>A	p.R404K	ж	15,0	0,8	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Примечание. н/д – нет данных.



1.1.2.4. Генотип-фенотипические корреляции

Анализ обнаруженных патогенных вариантов гена *GLA* и их связь с измеренными биохимическими показателями позволили выявить и описать ряд корреляций [829].

Из 32 (28,1%) пациентов, обладающих мутациями гена *GLA*, которые приводят к синтезу укороченного белка, информация о возрасте постановки диагноза и значения концентрации лизо-Гб3, измеренные до проведения Ф3Т, были известны для 14 пациентов с БФ.

Эта информация способствовала выявлению достоверных различий ($p=0,015$) в значениях концентрации лизо-Гб3 у пациентов с мутациями гена *GLA*, приводящими к преждевременной терминации трансляции («количественные» мутации), и любыми другими мутациями, при этом достоверных различий в возрасте постановки диагноза между пациентами с «количественными» и любыми другими мутациями гена *GLA* обнаружить не удалось ($p=0,933$) (табл. 10).

Таблица 10. Расчет корреляции медианных показателей концентрации лизо-Гб3 и возраста постановки диагноза у пациентов с «количественными» и любыми другими мутациями гена *GLA*

Параметр	«Количественные» мутации	Другие мутации	р-значение (U-критерий Манна-Уитни)
Концентрация лизо-Гб3, нг/мл	34,2 (5,2–60,2)	8,0 (2,2–29,0)	0,015
Возраст постановки диагноза, лет	34,5 (23,5–48,0)	36,5 (20,0–48,5)	0,933

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

Из представленных в табл. 10 данных очевидно, что медиана концентрации лизо-Гб3 у пациентов с мутациями, преждевременно терминирующими синтез кодируемого белка, более чем в 3 раза превышает медиану концентрации лизо-Гб3 у пациентов с любыми другими мутациями гена *GLA*.

При этом разделение групп по гендерному признаку наглядно демонстрирует достоверные различия между полами не только по значениям концентрации лизо-Гб3 ($p<0,001$), но и по возрасту постановки диагноза ($p=0,032$) (табл. 11).

Таблица 11. Расчет корреляции медианных показателей концентрации лизо-Гб3 и возраста постановки диагноза у пациентов, разделенных по гендерному признаку

Параметр	Мужчины	Женщины	р-значение (U-критерий Манна-Уитни)
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

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

Таким образом, медиана концентрации лизо-Гб3 у мужчин почти в 8 раз превосходит медиану концентрации лизо-Гб3 у женщин, тогда как возраст постановки диагноза у мужчин достоверно ниже, чем у женщин.

Концентрации лизо-Гб3 также достоверно различаются как в группах мужчин с «количественными» и любыми другими мутациями ($p=0,017$), так и в группах женщин с различными категориями патогенных вариантов гена *GLA* ($p=0,010$) (табл. 12).

Таблица 12. Расчет корреляции медианных показателей концентрации лизо-Гб3 у мужчин и женщин с «количественными» и любыми другими мутациями гена *GLA*

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

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

Однако небольшой объем полученных данных связан с тем, что большинство семей с БФ имеет неповторяющиеся в других семьях патогенные варианты гена *GLA*, а также со значительной фенотипической изменчивостью у лиц с одинаковыми патогенными вариантами, даже в рамках одной семьи. К примеру, дизиготные близнецы с новой мутацией с.521G>A, р.С174Y проявляют фенотипическую изменчивость,

демонстрируя манифестацию БФ со стойкой протеинурией с восьмилетнего возраста в одном случае и полное отсутствие каких-либо симптомов БФ до 18-летнего возраста в другом.

Лица с более поздними атипичными формами БФ, включающими почечные или сердечные проявления, обладают миссенс-вариантами, зачастую позволяющими проявлять значительную остаточную активность α -галактозидазы А (15–30% от уровня нормальной активности у мужчин) и невысокие уровни лизо-Гб3 ($6,3 \pm 2,3$ нг/мл у мужчин), что было описано ранее [806, 807]. Так, анализ клинической картины обладателей патогенных вариантов *p.N215S*, *p.I239M* и *p.I253T* демонстрирует поздний возраст постановки диагноза и поражение лишь одной из трех систем организма (почки, сердце, центральная нервная система), по сравнению с пациентами, обладающими патогенными вариантами, связанными с классическим фенотипом, что сочетается с зарубежными данными [248, 838]. Для патогенного варианта *p.N215S* гена *GLA* нам также удалось обнаружить внутрисемейную фенотипическую изменчивость: у одного из двух братьев развилась терминальная стадия ХПН в 31 год, тогда как второй испытывает временами лишь боли в сердце с сохранными почками и нормальным уровнем белка в моче, что может указывать на участие различных модифицирующих факторов в развитии болезни [104]. Значения лизо-Гб3, выявленные у представителей мужского пола, геном которых содержит эти мутации, достоверно отличаются от значений лизо-Гб3, измеренных у мужчин с любыми другими мутациями гена *GLA* ($p=0,001$) (табл. 13), что указывает на возможное использование этого биомаркера для прогнозирования развития классической или атипичной формы БФ у пациентов с не описанными ранее вариантами генома [833].

Таблица 13. Расчет корреляции медианных показателей концентрации лизо-Гб3 и возраста постановки диагноза у мужчин с мутациями *p.N215S*, *p.I239M*, *p.I253T*, *p.D299H* и мужчин с любыми другими мутациями гена *GLA*

Параметр	<i>p.N215S</i> ; <i>p.I239M</i> ; <i>p.I253T</i> ; <i>p.D299H</i>	Другие мутации	р-значение (U-критерий Манна-Уитни)
Концентрация лизо-Гб3, нг/мл	8,6 (7,0–8,7)	44,8 (21,4–65,0)	0,001
Возраст постановки диагноза, лет	41,0 (38,0–48,0)	32,0 (18,0–45,0)	0,073

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



Принимая во внимание невысокую концентрацию лизо-Г63, а также атипичное течение болезни у 68-летнего пациента с поражением почек, мутация *c.895G>C*, *p.D299H*, не описанная ранее, также была отнесена к мягким мутациям гена *GLA*. Из представленных в табл. 13 данных очевидно, что возраст постановки диагноза различается между группами пациентов с мутациями, вызывающими атипичный фенотип БФ, и пациентов с любыми другими мутациями. Однако эти различия имеют лишь тенденцию к достоверности, тогда как зарубежные ученые, проводившие похожие исследования на значительно больших выборках пациентов с БФ, обнаружили значимые различия как в значениях концентрации накапливаемого субстрата, так и в возрасте постановки диагноза между группами пациентов с классической и атипичной формой БФ, вызванной рассматриваемыми нами вариантами генома [566, 719].

Кроме того, удалось описать мутации, обнаруженные у пациентов с ранними инсультами: *c.723dup* (женщина в 45 лет), *c.782G>T* (женщина в 18 лет и женщина в 22 года), *c.1277_1278del* (мужчина в 32 и повторно в 33 года), *c.109G>A* (мужчина в 49 лет), *c.1025G>A* (мужчина в 35 и 36 лет), *c.658C>T* (мужчина в 29 лет), *c.844A>C* (мужчина в 26 лет), *c.835C>A* (женщина в 49 и повторно в 52 года), *c.1134T>A* (мужчина в 26 лет, повторно в 27 и 28 лет), *c.612G>C* (мужчина в 44 года), *c.1156C>T* (мужчина в 32 года), возраст наступления инсульта у пациентов с мутациями *c.679C>T* и *c.1197C>A* выяснить не удалось. В группе пациентов с БФ и ранними инсультами не было выявлено достоверных различий ($p=0,073$) у пациентов с мутациями, приводящими к преждевременной терминации трансляции, по сравнению с пациентами, геном которых содержит любые другие патогенные варианты гена *GLA* (табл. 14).

Таблица 14. Расчет ассоциации «количественных» мутаций с развитием инсульта у пациентов с БФ

Параметр	Число пациентов		р-значение (критерий Фишера)
	с инсультом	без инсульта	
Другие мутации	7	61	0,073
«Количественные» мутации	8	24	

Однако при разделении по полу выяснилось, что у мужчин, геном которых содержит «количественные» 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) (табл. 15). В группе женщин с БФ, отягощенной инсультами, достоверной ассоциации с типом мутаций обнаружить не удалось ($p=0,516$).

Таблица 15. 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	

Также отмечены были мутации, найденные у пациентов с тХПН: *c.1228A>G*, *c.786del*, *c.901C>T*, *c.818T>C*, *c.982G>C*, *c.161T>C*, *c.427G>A*, *c.166T>A*, *c.547G>A*, *c.508G>T*, *c.679C>T*, *c.19G>T*, *c.1197G>A*, *c.658C>T*, *c.109G>A*, *c.166T>A*, *c.203T>C*, *c.161T>C*, *c.612G>C*, *c.644A>G*, *c.821G>A*, *c.834del*, *c.895G>C*, *c.901C>T*, *c.1134T>A*, *c.1025G>A* [41]. Обращает на себя внимание тот факт, что достоверной связи «количественных» мутаций с тХПН обнаружить не удалось ($p=0,805$) (табл. 16).

Таблица 16. Расчет ассоциации «количественных» мутаций с тХПН у пациентов с БФ

Параметр	Число пациентов		р-значение (критерий Фишера)
	с тХПН	без тХПН	
Другие мутации	18	49	0,805
«Количественные» мутации	7	25	

Разделение пациентов с тХПН по половому признаку позволило выявить лишь тенденцию к достоверной ассоциации у мужчин с мутациями в гене *GLA*, приводящими к преждевременной терминации трансляции ($p=0,096$).

Необходимо отметить, что измерение концентрации биомаркера лизо-Гб3 позволило выявить достоверные корреляции его особенно высокого уровня у пациентов с тХПН и, преимущественно, у пациентов с тХПН, перенесших хотя бы один инсульт (табл. 17). Полученные данные указывают на то, что у пациентов с тХПН, перенесших по меньшей мере один инсульт, медианная концентрация лизо-Гб3 почти в два раза пре-

восходит медианную концентрацию лизо-Гб3, вычисленную у пациентов, достигших тХПН и не перенесших инсульт, что может свидетельствовать об особенной тяжести клинической картины БФ и являться неблагоприятным прогностическим фактором развития инсульта у пациентов с тХПН.

Таблица 17. Расчет корреляции значений лизо-Гб3 в группе пациентов с тХПН, а также в группе пациентов с тХПН, перенесших хотя бы один инсульт

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

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

Кроме того, удалось выявить достоверные различия в медианных значениях концентрации лизо-Гб3 у мужчин с БФ до проведения ФЗТ и во время проведения ФЗТ ($p < 0,001$) (табл. 18), что подтверждает данные иностранных коллег о том, что этот биомаркер может использоваться в качестве мониторинга проводимой ФЗТ [824].

Нам удалось измерить концентрацию лизо-Гб3 лишь у одной женщины с БФ, находящейся на ФЗТ, поэтому обсчитать данные при помощи критерия Уилкоксона не представилось возможности, однако мы можем констатировать незначительное снижение значения лизо-Гб3 через 6 месяцев после начала терапии с 9,4 нг/мл до 7,3 нг/мл.

Таблица 18. Расчет достоверности различий в значениях концентрации лизо-Гб3 до проведения ФЗТ и через 6 месяцев после начала терапии у российских мужчин с БФ

Проведение ФЗТ	Число пациентов	Концентрация лизо-Гб3, нг/мл	р-значение (критерий Уилкоксона)
До ФЗТ	54	39,3 (19,1–63,4)	<0,001
Во время ФЗТ	12	21,3 (10,1–35,9)	

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

1.1.2.5. Оптимизация алгоритма генетической диагностики болезни Фабри

Наши исследования также подтвердили мировую тенденцию, указывающую на то, что большинство мутаций приходится на экзоны 06 и 07 гена *GLA*, при этом наибольшее разнообразие выявленных вариантов (16/25,4%) обнаружено в экзоне 06 (рис. 14). Чаще других встречались нонсенс-мутации *c.679C>T*, *p.R227** и *c.658C>T*, *p.R220**, описанные выше и выявленные в четырех и трех семьях соответственно.

Пристального внимания заслуживают нуклеотидные замены *c.247G>A*, *p.N83D*; *c.376A>G*, *p.S126G* и *c.427G>A*, *p.A143T*, выявленные в результате проведенного селективного скрининга пациентов (первые две у женщин, последняя у мужчины), находящихся на гемодиализном лечении. Вариант *c.376A>G* был обнаружен также у совершеннолетнего сына, однако уровень активности его α -галактозидазы А и концентрация лизо-Гб3 были в пределах нормальных значений. Вариант *c.427G>A* был выявлен у 36-летнего мужчины, регулярно употребляющего спиртные напитки. Его ферментативная активность была близка к нижней границе нормы, а концентрация накапливаемого субстрата – в норме. Эти нуклеотидные варианты имеют описание в мировой литературе, однако их патогенность носит противоречивый характер [177, 607]. В нашем случае ни одному из четырех пациентов, обладающих этими вариантами гена *GLA*, имеющих противоречивую патогенность, не был выставлен клинический диагноз БФ, а терминальная стадия ХПН, по всей видимости, была вызвана другими болезнями. Это заключение было подкреплено данными измерения концентрации биомаркера лизо-Гб3, значения которого во всех трех исследованных случаях оказались в пределах референсных значений.

Особый интерес представляет и нуклеотидный вариант *c.937G>T*, *p.D313Y*, патогенность которого также противоречива по данным литературы [184, 347, 572]. В ходе проведенного нами исследования удалось обнаружить 22 пациента с этим нуклеотидным вариантом в соотношении 17:5 в пользу женщин. При этом лишь у одного мужчины с поражением почек была незначительно снижена активность α -галактозидазы А при концентрации биомаркера лизо-Гб3 в пределах референсных значений, что при отсутствии других клинических проявлений БФ можно считать свидетельством псевдодефицитной активности исследованного фермента. Трое других мужчин являлись родственниками женщин, чьи варианты были выявлены посредством секвенирования гена *GLA*. Значения концентрации лизо-Гб3 всех 17 женщин с вариантом *c.937G>T* гена *GLA* также были нормальными.



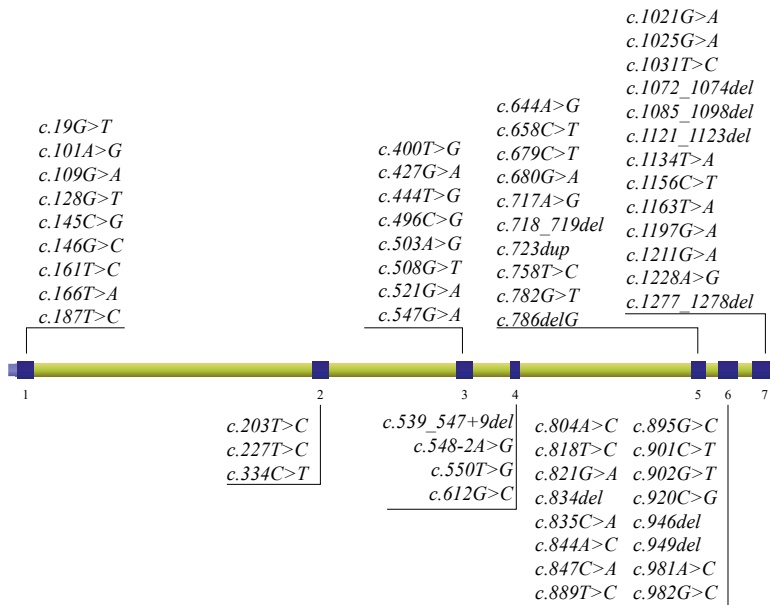


Рис. 14. Мутации, выявленные в результате проведенного исследования, на карте гена *GLA* (NM_000169.2)

Таким образом, исследования концентрации накапливаемого в лизосомах клеток субстрата способны эффективно вычислять ложноположительных пациентов, выявленных методом секвенирования по Сэнгеру, идентифицируя клинически значимые мутации гена *GLA*, приводящие к развитию БФ. Существуют данные об успешном использовании этого биомаркера для неонатального скрининга мужчин на БФ [229], однако для выяснения эффективности применения этого биомаркера в качестве аналита для проведения неонатального скрининга требуется проведение соответствующих исследований у российских пациентов.

Значительное число вариантов гена *GLA* с противоречивой патогенностью, ненадежный метод ферментативной диагностики БФ у женщин свидетельствуют в пользу использования биомаркера лизо-Гб3 в качестве аналита для теста первого уровня при скрининговой диагностике БФ у мужчин и теста второго уровня после секвенирования кодирующих и прилегающих интронных областей гена *GLA* – у женщин.

На основании анализа данных, полученных в ходе проведенного исследования БФ у обследованных российских мужчин, может быть предложен следующий алгоритм генетической диагностики:

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

2) в случае получения завышенных значений концентрации биомаркера лизо-Гб3, – исследование активности фермента α -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 рекомендуемый алгоритм генетической диагностики БФ у российских женщин должен 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.

1.1.2.6. Выводы

Разработанные методы тандемной масс-спектрометрии и молекулярно-генетического исследования позволили провести скрининговое обследование более 15 000 пациентов с подозрением на БФ и предложить измерение концентрации биомаркера лизо-Гб3 в качестве первого этапа диагностики БФ у мужчин в группах высокого риска, а также описать географические и генетические особенности БФ у российских пациентов, определив частоту и спектр 63 различных вариантов гена *GLA* у 162 пациентов из 77 семей, пополнив базу HGMD 24 новыми мутациями, что составляет почти 3% всех описанных в ней патогенных вариантов гена *GLA*, вызывающих БФ. Впервые было показано, что у мужчин, геном которых содержит мутации гена *GLA*, приводящие к преждевременной терминации трансляции, 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). Кроме того, были обнаружены достоверные корреляции концентрации лизо-Гб3 с ранними инсультами ($p=0,003$) и с ранними инсультами у пациентов с тХПН ($p=0,004$). 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 ($p<0,001$), а также у пациентов с БФ, распределенных по группам в зависимости от влияния типа мутации на кодируемый белок ($p=0,015$). Кроме 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.

1.1.3. МУКОПОЛИСАХАРИДОЗЫ

Мукополисахаридозы представляют большую группу редких наследственных болезней мультисистемной и полиорганной симптоматики, обусловленных нарушением метаболизма гликозаминогликанов (ГАГ), возникающим вследствие генетических дефектов лизосомных ферментов, расщепляющих их. В начале 1900-х годов Гертруда Гурлер и Чарльз Хантер впервые описали пациентов с мукополисахаридозами (МПС), чьи метаболические расстройства в настоящее время носят их имена [481, 482]. В 1933 году врачи Бинсвангер и Ульрих ввели термин множественный дизостоз, чтобы описать совокупность скелетных нарушений, характерных для лиц с МПС и другими ЛБН [152]. В 1952 году Бранте выделил мукополисахариды из печени и менингеальных тканей у больных МПС; впоследствии термин мукополисахаридозы закрепился для описания этого семейства заболеваний [176]. В 1957 году Дорфман и Лоринц разработали клинические анализы для выявления в моче мукополисахаридов. Нейфельд с соавторами в конце 1960-х годов показали, что в фибробластах пациентов с синдромами Гурлер и Хантера накапливаются различные мукополисахариды, предположив, что это фибробласты пациентов с разными типами МПС. Это привело к выделению и последующей идентификации каждого дефектного лизосомного фермента среди разных типов МПС [386].

Практически каждый тип МПС, за исключением МПС VI–VIII, подразделяется на два и более подтипов. Например, в случае МПС, тип I, обусловленного дефицитом α -L-идуронидазы, выделяют три синдрома (синдром Гурлер, синдром Гурлер–Шейе и синдром Шейе), причем тяжесть заболевания усиливается при переходе от синдрома Шейе к синдрому Гурлер. Напротив, в случае синдрома Санфилиппо (МПС III) выделяют 4 подтипа, каждый из которых обусловлен дефицитом какой-нибудь одной из четырех гидролаз, расщепляющих гепарансульфат. Больные МПС, тип III имеют большое сходство клинических симптомов, включая неврологические нарушения (прогрессирующую деменцию, агрессивное поведение, гиперактивность, эпилептические припадки и т.д.) [957], но различаются генетическими причинами [282]. Кроме того, для многих типов МПС избыточные количества определенных классов ГАГ, обнаруживаемые в моче, перекрываются. Например, у больных МПС I, МПС II и МПС VII в моче обнаружива-



ется как гепарансульфат, так и дерматансульфат. Следовательно, для постановки конкретного типа или подтипа МПС необходим ферментативный и последующий молекулярно-генетический анализ. Особенно это важно для правильного выбора терапии.

МПС обусловлены патогенными нуклеотидными вариантами генов, кодирующих 11 лизосомных ферментов-гидролаз, которые отвечают за многостадийный распад ГАГ (рис. 15). Все МПС наследуются в соответствии с аутосомно-рецессивным типом за исключением синдрома Хантера, который наследуется строго по материнской линии ввиду генетических нарушений в локусе *IDS*, расположенном в хромосомной области Xq28 [1034].

Этиологические мутации, приводящие к развитию болезни, выявляют различными способами анализа нуклеотидной последовательности, которые включают как классическое прямое секвенирование ДНК генов-мишеней по Сэнгеру, так и приложения методов секвенирования нового поколения, позволяющие исследовать одновременно таргетные последовательности всех генов, мутации которых вызывают МПС.

Как правило, у больных МПС до 95% мутаций представляют собой точковые мутации (то есть изменения в одном нуклеотиде), либо небольшие делеции или вставки нескольких нуклеотидов. Их можно надежно обнаружить с использованием методов секвенирования ДНК. Однако в некоторых случаях, особенно в случае МПС II, до 20% мутаций могут представлять собой крупные структурные мутации, в том числе перестройки и делеции отдельных фрагментов генов или даже всего гена целиком [573]. Для обнаружения таких протяженных генетических нарушений необходимо использовать другие стратегии исследования, такие как ДНК-блоттинг по Саузерну и/или мультиплексная лигазная амплификация (MLPA, multiplex ligation-dependent probe amplification) [844].

Наилучшим способом уверенной идентификации МПС является комплексный подход, который представляет собой последовательное и оптимальное сочетание биохимических (измерение общего содержания ГАГ в моче больных, определение типа ГАГ, проведение специфических ферментативных анализов в крови) и молекулярно-генетических (анализ ДНК) методов лабораторной диагностики.

Использование количественного и качественного анализа ГАГ в моче на первом этапе скрининга пациентов с клиническими признаками, предполагающими наличие МПС, позволяет выделить типы МПС, имеющие общие продукты накопления. Например, для пациентов с МПС IV характерно присутствие в моче кератансульфата, который отсутствует во всех других типах МПС [479]. Последующее определение активности специфической гидролазы, расщепляющей



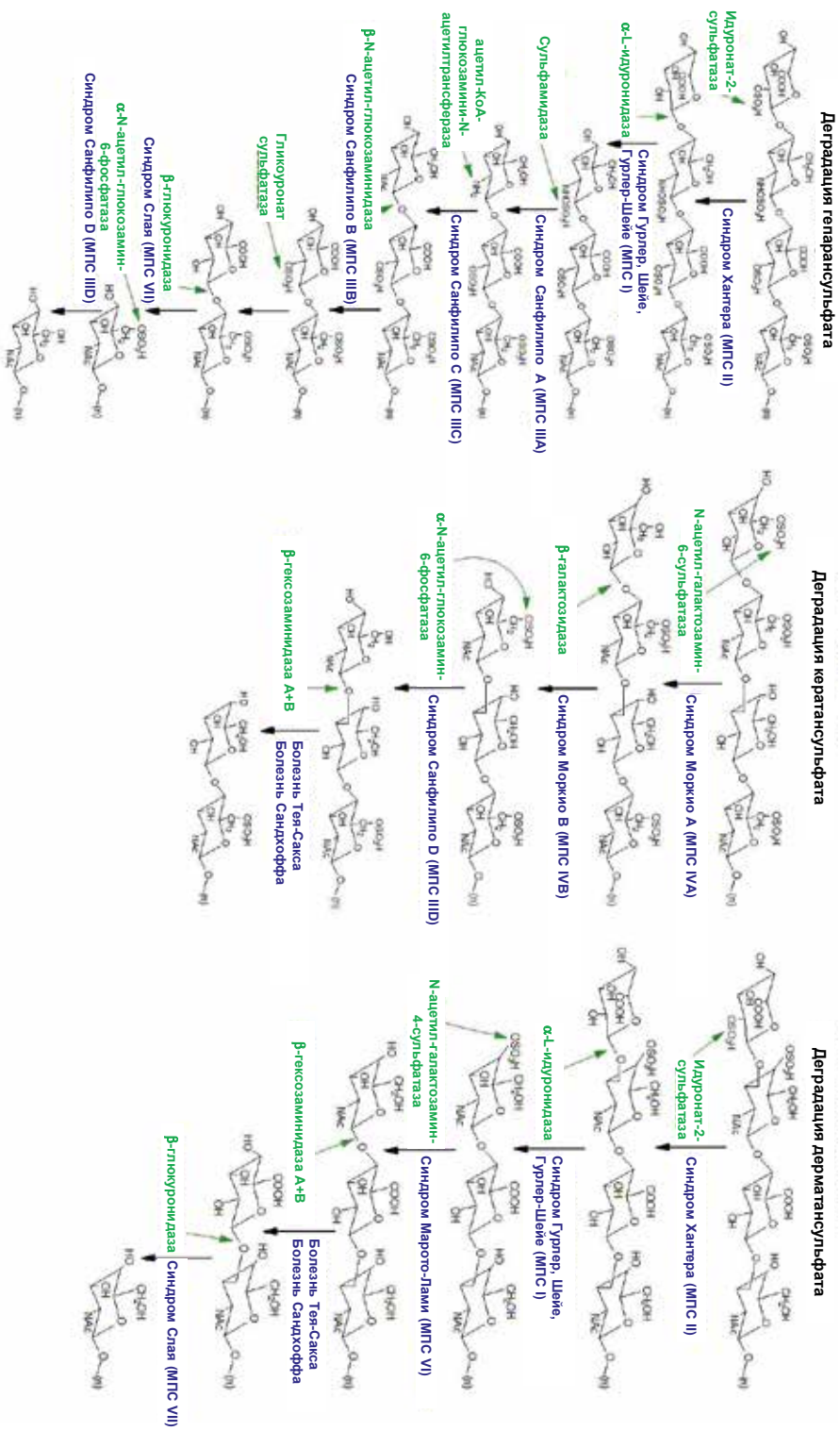


Рис. 15. Схема ферментативного расщепления различных ГА_Г (гепарансульфата, кератансульфата и дерматансульфата) в лизосомах. Зеленым цветом приведены названия ферментов (гидролаз), катализирующих последовательную дегградацию ГА_Г. Синим цветом выделены названия типов МПС, к которым приводят мутации в генах, кодирующих гидролазы



ГАГ, в крови пациента позволяет определить тип (или подтип) заболевания внутри группы МПС, имеющих общий спектр ГАГ в моче. Молекулярно-генетический анализ ДНК на подтверждающем этапе необходим для выявления точного характера генетического нарушения, которое может быть ассоциировано с определенным фенотипом заболевания, поскольку одни мутации существенно понижают активность фермента, в то время как другие приводят к его полной инактивации. Соответственно, при сохранении остаточной каталитической активности фермента больной будет иметь менее суровое проявление МПС по сравнению с теми, у кого наблюдается полный дефицит фермента.

1.1.3.1. Мукополисахаридоз, тип I

Мукополисахаридоз, тип I – редкое наследственное заболевание, обусловленное мутациями гена *IDUA*, патогенное действие которых приводит к сниженной активности α -L-идуронидазы, вызывая накопление дерматансульфата и гепарансульфата во всех клетках организма и оказывая прогрессирующее мультисистемное поражение органов и тканей [269]. Расчетная частота этого панэтнического заболевания сильно варьирует в различных популяциях и оценивается в среднем как 1 случай на 100 000 живых новорожденных [681], колеблясь от 1 случая на 26 206 живых новорожденных в Ирландии при носительстве болезни у каждого 81 живорожденного в популяции [692] до 7 случаев на 1 млн живых новорожденных в Германии [110]. Разделяют три формы МПС, тип I в зависимости от возраста манифестации и тяжести клинических проявлений. Синдром Гурлер, OMIM 607014, синдром Гурлер–Шейе, OMIM 607015 и синдром Шейе, OMIM 607016. Все три формы МПС I наследуются по аутосомно-рецессивному типу.

Синдром Гурлер – тяжелая форма, встречающаяся в среднем в 57% случаев МПС I, была впервые описана шотландским врачом Джоном Томпсоном в 1900 году, который назвал ее гарголизмом. Позднее, в 1919 году, болезнь была описана немецким педиатром Гертрудой Гурлер на примере двух пациентов с «умственной отсталостью, патологией позвоночника и помутнением роговицы». И лишь в 1962 году американский офтальмолог Гарольд Глендон описал на примере своих пациентов мягкую форму синдрома, встречающуюся лишь в 20% случаев МПС I. Позднее за этой формой МПС I закрепилось название синдром Шейе. Промежуточная форма встречается приблизительно в 23% случаев МПС I [127].

Патогенез МПС, тип I напоминает по своей сути патогенез любого другого ЛБН и очень похож на механизм возникновения других типов



МПС. Патогенные варианты гена *IDUA* кодируют дефектный фермент α -L-идуронидазу, который не способен должным образом расщеплять молекулы гепарансульфата и дерматансульфата, вслед за идуронат-2-сульфатазой на втором этапе каскадного расщепления ГАГ.

ГАГ, ввиду сильно отрицательного заряда, привлекают к себе значительное количество молекул воды, которые, в свою очередь, приводят к набуханию нерасщепленных ГАГ. Аккумуляция ГАГ происходит в лизосомах клеток организма человека, что приводит в конечном счете к апоптозу этих клеток, после чего ГАГ начинают накапливаться в межклеточном матриксе. Когда их количество в формируемой соединительной ткани достигает предельных концентраций, начинается накопление коллагена, вследствие чего соединительная ткань постепенно деформируется, что и приводит к появлению клинических проявлений болезни [714]. Соответствующая прогрессирующая симптоматика проявляется в дисморфизме лица, помутнении роговицы, гепатоспленомегалии, клапанной болезни сердца, кардиомиопатии, обструктивных заболеваниях дыхательных путей [102], тяжелой когнитивной задержке, потере слуха [268], деформации скелета, тугоподвижности суставов [752]. Средний возраст проявления клинических симптомов синдрома Гурлер составляет от 3 месяцев до года [127]. В 3 месяца опытный клинический генетик может обнаружить первичные признаки огрубления черт лица. Постепенно увеличиваются лобные кости, утапливается переносица, расширяется кончик носа, полнеют губы и щеки. После трех лет рот постоянно открыт, учащаются выделения из носа. Глаза, как правило, широко посажены, при этом сами глазницы имеют маленький размер. Радиологическими методами выявляются расширение ребер и тазовых костей, обнаруживается яйцевидная форма позвонков. После года наблюдаются деформации различных отделов позвоночника, позднее развивается прогрессирующая скелетная дисплазия [691]. Рост детей, как правило, значительно замедляется после двух лет, а максимальный рост не превышает 1 метра и 40 сантиметров. С двухлетнего возраста наблюдается прогрессирующая артропатия и дизостоз, развивается кистевой туннельный синдром. Заболевание сопровождается частыми инфекциями верхних и нижних дыхательных путей, вплоть до развития обструктивной болезни, в большинстве случаев возникают нарушения в работе сердечных клапанов. При этом при рождении дети кажутся совершенно нормальными, за исключением паховых и пупочных грыж, которые зачастую возникают в первые месяцы жизни, начиная с момента рождения. Накопление ГАГ в межклеточном матриксе в конечном счете приводит к нарушению функциональной деятельности некоторых органов и систем организма больного ребенка. Средняя продолжительность жизни детей, больных синдромом Гурлер, составляет 10–12 лет [688].

Люди с менее тяжелой формой болезни обладают далеко не всеми перечисленными симптомами. Они, как правило, могут иметь лишь незначительные огрубления черт лица, сохраняют нормальный рост и зачастую обладают нормальным интеллектом. Чаще всего синдром Шейе не диагностируется ранее второй декады жизни. Продолжительность жизни больных этим синдромом может не сильно отличаться от средней продолжительности жизни в популяции [938].

Алгоритм диагностики МПС I включает в себя следующую последовательность диагностических мероприятий: обследование клинического генетика, количественное и качественное измерение ГАГ в моче, ферментативное и подтверждающее молекулярно-генетическое обследование пациента с подозрением на МПС I. К скрининговым методам лабораторной диагностики всех типов МПС, и МПС I в частности, относится количественное и качественное определение ГАГ в моче. В случае обнаружения повышенных уровней гепарансульфата и дерматансульфата и клинической картины МПС I, необходимо провести ферментативную диагностику этой болезни, которая до сих пор считается золотым стандартом лабораторной диагностики. Чаще всего она осуществляется, либо с помощью иммунофлуоресцентного измерения активности α -L-идуронидазы в фибробластах или лимфоцитах периферической крови, либо с помощью тандемного масс-спектрометрического измерения активности α -L-идуронидазы в пятнах крови, высушенных на фильтровальной бумаге [690]. В случае выявления сниженной ферментативной активности проводится подтверждающая молекулярно-генетическая диагностика.

Длина гена *IDUA*, расположенного в хромосомной области 4p16.3 и включающего 14 экзонов, составляет 19 т.п.н., тогда как молекулярный вес кодируемого белка составляет 74 кДа [851]. К настоящему времени в базе HGMD описано 223 мутации этого гена, 59% которых составляют миссенс- и нонсенс-мутации, 21% составляют небольшие делеции и дупликации гена, более 16% составляют мутации, оказывающие влияние на сплайсинг, и еще почти 4% – крупные структурные перестройки гена [472]. Более 96% всех известных мутаций выявляется с помощью стандартного метода секвенирования всех кодирующих и прилегающих интронных областей гена *IDUA* [137]. Оставшиеся 4% мутаций выявляются количественной ПЦР, а также с помощью метода MLPA. К настоящему времени для этого заболевания описаны частые мутации, расположенные в первом и втором экзонах гена, с которых зачастую и начинается молекулярно-генетическая диагностика. Для МПС I описаны фенотипические корреляции, характерные для различных подтипов болезни, на основании которых многие специалисты ставят лабораторный диагноз вплоть до подтипа, а клиницисты

назначают соответствующее лечение [927]. Например, нонсенс-мутации p.W402X и p.Q70X характерны для синдрома Гурлер; кроме того, считается, что некоторые полиморфизмы также могут вносить определенный вклад в клиническую картину болезни, модифицируя влияние основных мутаций на фенотип больного [742, 853].

В большинстве случаев для лечения всех пациентов с МПС I без клинических проявлений вовлеченности ЦНС применяется комплексный мультидисциплинарный подход, ключевым элементом которого является патогенетическая терапия ларонидазой (Aldurazyme®, Джензайм). Препарат, одобренный FDA в 2003 году, способствует выведению избыточного количества ГАГ из организма. Терапию следует начинать до возникновения необратимых повреждений органов и тканей [349] в количестве 100 ед/кг с частотой 1 раз в неделю. В результате своевременно начатой ФЗТ уменьшается объем печени, заметно улучшаются легочная и двигательная функции, четкий биологический эффект демонстрирует шестиминутный пошаговый тест на фоне уменьшения экскреции ГАГ в среднем до 70% [251]; кроме того, значительно улучшается состояние пациентов, имевших значительный апноэ сна до терапии, доказывая эффективность и безопасность ФЗТ на протяжении многих лет [875].

В случае синдрома Гурлер ФЗТ не может остановить прогрессирующее разрушение ЦНС, даже в случае раннего начала терапии, поэтому аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), проведенная детям с фактором развития $DQ>70$ в возрасте до 2–2,5 лет [281] с обязательной подготовкой ФЗТ в целях улучшения претрансплантационного [380] и посттрансплантационного клинического состояния является золотым стандартом терапии таких пациентов [746]. Наилучшим решением терапии является ТГСК от здорового брата с тем же набором антигенов главного комплекса гистосовместимости.

В последнее время благодаря повышению безопасности этой процедуры ТГСК стала применяться для лечения пациентов с синдромом Гурлер–Шейе, которые подвержены риску прогрессирующего нейрокогнитивного нарушения [81]. Своевременная ТГСК является единственным методом лечения МПС I, позволяющим успешно остановить либо отдалить прогрессирование когнитивной задержки [281] за счет дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток в глиальные клетки, что, в свою очередь, позволяет доставлять дефицитный фермент в ЦНС [207], при этом визуально уменьшается толщина мозговых оболочек, тем самым предотвращая развитие гидроцефалии [161]; он также действует на другие органы и системы организма, замедляя прогрессирование повреждения, в частности, улучшается зрение, работа суставов, сердца и легких [162]. После первого случая ТГСК пациенту с синдро-

мом Гурлер [444] более 500 пациентов прошли через эту процедуру за 35 лет [82]. За это время накопилось значительное количество данных, анализ которых указывает на строгую корреляцию между возрастом трансплантации и лучшим долгосрочным прогнозом развития детей с синдромом Гурлер, трансплантированных в возрасте до 9 месяцев [764], указывая на решающее значение ранней диагностики для достижения оптимального исхода.

Поскольку раннее начало лечения, предполагающего ТГСК и/или ФЗТ, значительно улучшает состояние большинства пациентов [349, 756], ранняя диагностика имеет исключительную важность для любой стратегии терапии. Однако переменная клиническая картина и неспецифические признаки и симптомы в сочетании с редкостью описываемого расстройства часто приводят к длительной диагностической задержке [269], поэтому массовый скрининг новорожденных является наилучшим способом выявления пациентов в раннем возрасте, что позволяет своевременно начинать лечение [850]. Однако для выбора оптимальной стратегии лечения каждого выявленного пациента с МПС I требуется раннее прогнозирование фенотипа, что весьма затруднительно в неонатальном возрасте, так как обычно оценка фенотипа основана на признаках, симптомах и возрасте манифестации болезни [688]. Поэтому алгоритм раннего определения фенотипа пациентов с МПС I, диагностированных в младенчестве, в сочетании с анализом выявленных мутаций и показателями остаточной активности фермента способствует выбору правильной тактики терапии в каждом конкретном случае [281, 522].

Преимплантационную диагностику проводят в семьях,отягощенных МПС I, при планировании беременности, а пренатальную диагностику в тех же семьях на ранних сроках уже состоявшейся беременности. Биохимическое измерение активности α -L-идуронидазы проводится как в ворсинах хориона, так и в клетках амниотической жидкости. Однако как пренатальную, так и преимплантационную диагностику, как правило, проводят при помощи молекулярно-генетического исследования, особенно в случае обладания информацией о семейных мутациях. Кроме того, строго рекомендовано проведение диагностики МПС I среди всех известных родственников обоих полов в профилактических целях.

В рамках данной научной работы ставилась задача оптимизировать алгоритм ранней диагностики МПС I при помощи ТМС с последующим секвенированием по Сэнгеру, а также изучить частоту и спектр выявленных мутаций, обнаруженных нами в результате селективного скрининга пациентов с подозрением на МПС I, а также пациентов, выявленных ранее, описав при этом особенности их фенотипа.



1.1.3.1.1. Селективный скрининг мукополисахаридоза, тип I

Двухэтапное исследование сухих пятен крови, изъятых у 4940 детей из различных регионов РФ с подозрением на МПС I, привело к выявлению 38 новых случаев болезни путем разработанного и валидированного метода определения сниженной активности α -L-идуруонидазы и последующего секвенирования кодирующих и прилегающих интронных областей гена *IDUA*.

До проведения селективного скрининга нами была выбрана отрезная точка 1,89 мкМ/л/ч для определения активности α -L-идуруонидазы. Это значение было выбрано на основе значения отрезной точки в работах зарубежных авторов [328, 715], а также с учетом полученных нами референсных значений активности α -L-идуруонидазы и значений активности этого фермента в группе подтвержденных пациентов с МПС I.

После проведения скрининга значение отрезной точки для определения активности α -L-идуруонидазы было оставлено на прежнем уровне 1,89 мкМ/л/ч. Это значение соответствовало максимальным показателям чувствительности (100%) и специфичности (100%) для определения активности α -L-идуруонидазы. Интервал значений активности этого фермента у всех 38 пациентов лежал ниже и не перекрывался со значением активности этого фермента в группе контроля. По всей видимости, отсутствие ложноположительных результатов может быть связано с отсутствием вариантов *p.A79T*, *p.H82Q*, *p.D223N* и *p.V322E*, описанных ранее как псевдодефицитные [253].

1.1.3.1.2. Клинические, географические и генетические особенности мукополисахаридоза, тип I

Для оценки генетических особенностей и соответствующих им клинических фенотипов, а также возрастных и географических характеристик обследованных нами российских пациентов, в общей сложности были проанализированы данные 54 пациентов средний возраст которых составил 5 лет и 4 месяца (стандартное отклонение 5 лет и 10 месяцев), медиана 2 года и 7 месяцев (от 4 месяцев до 25 лет) на момент проведения исследования. У всех обследованных пациентов диагноз был заподозрен на основе определенных клинических признаков, манифестировавших в среднем в возрасте 5 месяцев, медиана 3 месяца, стандартное отклонение 6 месяцев, начиная с первого месяца жизни и заканчивая двухлетним возрастом. Средний возраст поста-

новки диагноза составил 3 года и 5 месяцев, медиана 1 год и 5 месяцев. Возраст постановки диагноза устанавливался на основе биохимической и молекулярно-генетической диагностики 38 новых пациентов с МПС I, а также информации о биохимической диагностике из историй болезни 16 пациентов с диагнозом МПС I, установленным ранее, информация о генотипе которых отсутствовала. Средний возраст начала ФЗТ составил 3 года и 11 месяцев, медиана 2 года и 8 месяцев. Информация о лечении семи пациентов недоступна.

Географические особенности распространения МПС I на территории РФ удалось установить для 35 (76,1%) пациентов из 54 обследованных (табл. 19).

Таблица 19. Распределение обследованных нами пациентов с МПС I в различных субъектах РФ

Субъект	Численность населения	Число семей	Число случаев	Частота в субъекте*
Москва	12 615 882	9	10	1:1 261 588
Владимирская область	1 365 825	3	3	1:455 275
Краснодарский край	5 648 254	3	3	1:1 882 751
Ростовская область	4 202 337	3	3	1:1 400 779
Алтайский край	2 332 511	1	1	1:2 332 511
Красноярский край	2 874 050	1	1	1:2 874 050
Волгоградская область	2 507 488	1	1	1:2 507 488
Кемеровская область	2 674 283	1	1	1:2 674 283
Московская область	7 599 756	2	2	1:3799 878
Нижегородская область	3 214 657	1	1	1:3 214 657
Новосибирская область	2 793 389	1	1	1:2 793 389
Оренбургская область	1 921 908	1	1	1:1 921 908
Пермский край	2 610 800	2	2	1:1305400
Приморский край	1 902 719	1	1	1:1 902 719
Саратовская область	2 440 729	1	1	1:2 440 729
Санкт-Петербург	5 383 968	1	1	1:5 383 968
Тюменская область	3 807 658	1	1	1:3 807 658
Ульяновская область	1 238 424	1	1	1:1 238 424

Примечание *На основе выборки пациентов, обследованных в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.



Все выявленные случаи МПС I, для которых доступна информация о месте проживания, распределились по 18 (21,2%) субъектам РФ с преобладанием в Москве (10/28,6%), Владимирской и Ростовской областях (по 3/8,6%), а также в Краснодарском крае (3/8,6%). Значительный процент выявляемых случаев в этих четырех субъектах РФ может указывать как на высокую плотность населения, так и на высокий уровень осведомленности врачей, проявляющих настороженность в отношении мукополисахаридозов.

При переходе на уровень федеральных округов становится очевидно, что около половины обследованных пациентов проживают в Центральном федеральном округе (15/42,9%), в Южном федеральном округе проживают 7 (20,0%) пациентов, не состоящих в родстве, в Приволжском – 5 (14,3%) и Сибирском федеральном округе – 4 (11,4%), в Уральском – 2 (5,7%), Северо-Западном и Дальневосточном округах – по 1 (2,9%) (табл. 20).

Таблица 20. Распределение пациентов с МПС I в различных федеральных округах

Федеральный округ	Численность населения	Число семей	Число пациентов	Частота в округе*
Центральный	39 378 947	14	15	1:2625263
Южный	16 454 580	7	7	1:2350654
Приволжский	29 397 227	5	5	1:5 879 445
Сибирский	17 173 185	4	4	1:4293296
Уральский	12 350 131	2	2	1:6 175 066
Северо-Западный	13 972 061	1	1	1:13972061
Дальневосточный	8 188 594	1	1	1:8188594

Примечание. *На основе выборки пациентов, обследованных в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

У 25 (46,3%) обследованных пациентов удалось оценить частоты различных клинических проявлений МПС I на момент постановки диагноза по 14 различным параметрам (рис. 16).

У всех обследованных детей, клинические проявления которых удалось описать, были обнаружены грубые черты лица по типу «гарголизма». У 94% обследованных детей выявлялись гепатоспленомегалия, множественный дизостоз и помутнение роговицы. Грыжи, аномалии клапанов сердца/кардиомиопатия были описаны у 89% пациентов, тогда как храп и шумное дыхание – у 83% пациентов. Реже встречались: кар-



Рис. 16. Частоты различных клинических проявлений у пациентов с МПС I

пальный туннельный синдром, дисплазия тазобедренных суставов, синдром апноэ во сне, задержка психоречевого развития и стеноз шейного отдела позвоночника – у 56–67% пациентов. Макроглоссия диагностировалась у 50% детей. Дементным синдромом обладали лишь 11% пациентов. Фенотип обследованных нами пациентов по большей части совпадал с клиническими проявлениями МПС, тип I, описанными ранее [127].

Для оценки относительных частот и спектра мутаций, приводящих к развитию МПС I, было проведено молекулярно-генетическое исследование ДНК, выделенной из биоматериала 54 пациентов. В результате двунаправленного секвенирования всех 14 кодирующих экзонов гена *IDUA* с прилегающими интронными областями было обнаружено 33 различных варианта, что указывает на обширную аллельную гетерогенность МПС I. Для всех выявленных вариантов гена *IDUA* были рассчитаны доли, при этом принимались в расчет 53 неродственных пациента из 54 обследованных, поскольку две девочки являлись родными сестрами (рис. 17).

Большинство вариантов (19/63,3%) было выявлено у единичных пациентов в гетерозиготном состоянии. Наиболее частой мутацией, обнаруженной среди обследованных лиц, больных МПС I, оказалась мутация *c.208C>T*, расположенная во втором экзоне гена *IDUA*, приводящая к преждевременной терминации трансляции *p.Q70** и встретившаяся на 51 (47,2%) аллеле [55]. Значительное превалирование этой мутации гена *IDUA* над остальными вариантами описано у пациентов с МПС I в Польше и Скандинавии [137]. В среднем среди пациентов европейского происхождения она встречается с частотой 35% [192].

Необходимо отметить, что генотип $p.Q70^*/p.Q70^*$ также преобладает среди обследованных нами детей, встречаясь у 16 (29,6%) неродственных пациентов.

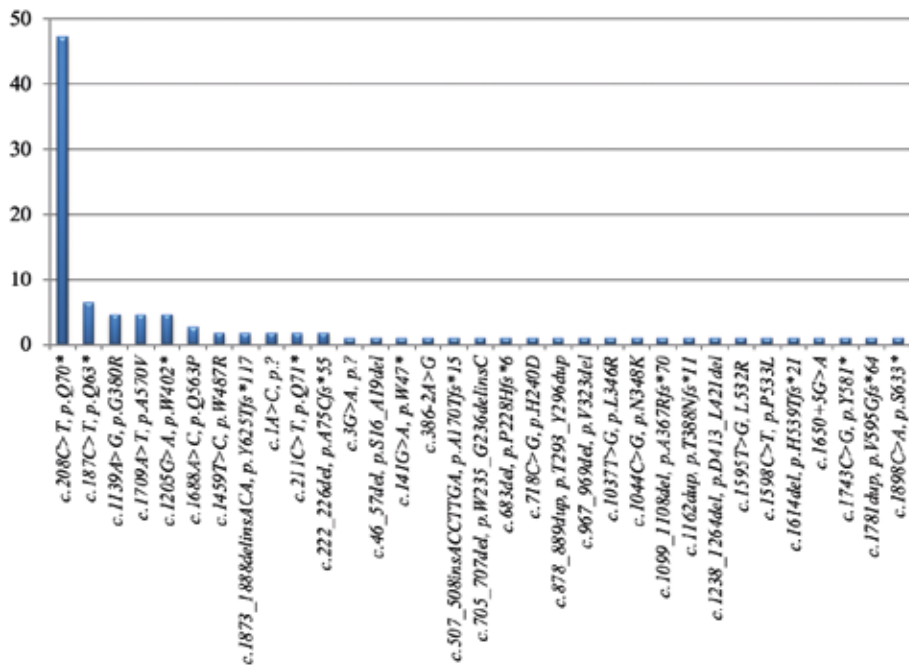


Рис. 17. Относительные частоты и спектр мутаций гена *IDUA* у российских пациентов с МПС I

Второй по относительной частоте оказалась нонсенс-мутация $c.187C>T, p.Q63^*$, обнаруженная на 7 (6,5%) пораженных хромосомах, миссенс-мутация $c.1139A>G, p.G380R$ была выявлена на 5 (5,6%) пораженных хромосомах. Нуклеотидный вариант $c.1709A>T, p.A570V$, не описанный ранее, был обнаружен на 5 (5,6%) аллелях у трех детей, двое из которых являются родными сестрами. Наиболее частой мутацией среди пациентов с МПС I европейского, североамериканского, латиноамериканского и австралийского происхождения считается мутация $c.1205G>A, p.W402^*$, описанная у 37%, 43%, 42,8% и 55% больных соответственно [192, 252, 759, 852]. Однако в нашем исследовании она выявлена лишь на четырех (4,4%) пораженных хромосомах. Большинство нуклеотидных вариантов (21/70,0%), идентифицированных в обследованной когорте больных, отсутствовало в базе данных gnomAD [376] на момент проведения исследования, при этом ни один из обнаруженных вариантов не имел популяционную частоту, превышающую 0,069%.

Среди обнаруженных вариантов гена *IDUA* незначительно преобладали 9 (27,3%) миссенс-мутаций, кроме того, было обнаружено 8 (24,2%) небольших делеций, 7 (21,2%) нонсенс-мутаций, 4 (12,1%) небольшие вставки, 4 (6,1%) мутации, нарушающие сайты сплайсинга, 2 (6,1%) мутации стартового кодона и 1 (3,0%) небольшая делеция/вставка (рис. 18). При этом мутации, приводящие к преждевременной терминации трансляции, либо нарушающие инициацию трансляции, были выявлены у 47 (87,0%) пациентов, что в большинстве случаев обусловило их тяжелый фенотип.

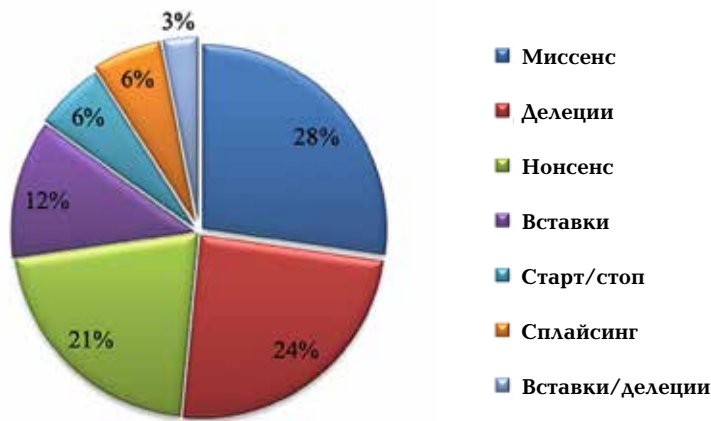


Рис. 18. Доли различных типов мутаций у обследованных пациентов с МПС I

1.1.3.1.3. Описание новых патогенных вариантов гена *IDUA*

Помимо 16 (48%) описанных ранее мутаций, 17 (52%) выявленных нами вариантов гена *IDUA* не были описаны ранее в базе данных HGMD. 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.Q71** (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*117* (PVS1, PS3, PM2, PP4) и одна мутация стартового кодона *c.3G>A, p.?* (PVS1, PS3, PM2, PP4) (рис. 19). В общей сложности новые мутации встретились у 22 (40,7%) обследованных нами пациентов.

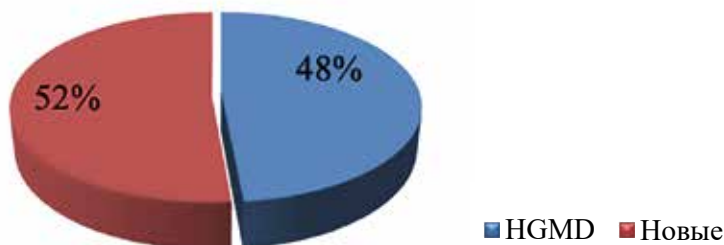


Рис. 19. Соотношение патогенных вариантов гена *IDUA*, описанных и не описанных ранее в международной базе данных HGMD

1.1.3.1.4. Генотип-фенотипические корреляции

Для 51 обследованного пациента (94,4%) подтип МПС I был установлен на основании клинической информации, что также позволило связать выявленные генотипы с фенотипом их носителей. В общей сложности 36 (70,6%) пациентов имели синдром Гурлер, 8 (15,7%) пациентов страдали синдромом Гурлер–Шейе, и синдром Шейе был установлен у 7 (13,7%) пациентов, что в целом соответствует усредненному мировому распределению, однако значительно отличается от частот пациентов с синдромом Гурлер в латиноамериканском (43%), и особенно азиатском (29%), регионах [127, 252]. К тяжелому фенотипу были отнесены пациенты с ранней манифестацией клинических проявлений в возрасте до 6 месяцев и грубой задержкой психомоторного развития в возрасте до 24 месяцев, остальные пациенты были отнесены к более «мягким» фенотипам.

Новый вариант *c.211C>T* гена *IDUA*, приводящий к преждевременной терминации трансляции *p.Q71**, расположенный в соседнем кодоне по отношению к наиболее частой мутации *p.Q70**[232], был обнаружен в гомозиготном состоянии у пациента с тяжелой клинической картиной МПС I. Вторая новая нонсенс-мутация *c.141G>A, p.W47** была выявлена в компаунд-гетерозиготном состоянии с мутацией *c.208C>T, p.Q70**. Terlato с соавт. считают, что уверенное фенотипическое предсказание возможно лишь для пациентов с биаллельными нонсенс-мутациями, описанными ранее для синдрома Гурлер [927], при

этом зачастую, чем ближе мутация к точке инициации трансляции, тем тяжелее может быть клиническое течение болезни, что напрямую связано с размером экспрессируемого белка и его активностью. Мутация *c.3A>G*, не описанная ранее, была идентифицирована нами у ребенка с тяжелым фенотипом в компаунд-гетерозиготном состоянии с нонсенс-мутацией *c.187C>T*, *p.Q63**, описанной ранее у пациентов с синдромом Гурлер из Советского Союза [996]. По данным биоинформатического источника Alamut Visual (версия 2.14), предполагается, что этот не описанный ранее вариант переносит точку инициации трансляции в положение 133 четвертого экзона кодируемого белка с потерей трех первых экзонов. Кроме того, *c.3A>G*, как и *c.1A>C*, описанный ранее, приводит к потере сигнальной пептидной последовательности кодируемого белка, что, в свою очередь, приводит к нарушению процесса транспортировки в эндоплазматический ретикулум и далее в лизосомы [571]. Варианты *c.507_508insACCTTGA*, *p.A170Tfs*15*; *c.1099_1108del*, *p.A367Rfs*70*; *c.1162dup*, *p.T388Nfs*11* и *c.1781dup*, *p.V595Gfs*64*, сдвигающие рамки считывания и приводящие к преждевременной терминации трансляции, были обнаружены у пяти пациентов в компаунд-гетерозиготном состоянии с мутацией *c.208C>T*, *p.Q70**. Во всех пяти случаях пациенты обладали тяжелым фенотипом, соответствующим описанию синдрома Гурлер. Новая делеция *c.222_226del*, приводящая к сдвигу рамки считывания *p.A75Cfs*55*, была обнаружена нами в гомозиготном состоянии у ребенка с тяжелым фенотипом, которому вскоре был выставлен синдром Гурлер. Небольшая делеция *c.967_969del*, не вызывающая сдвига рамки считывания *p.V323del*, была выявлена в компаунд-гетерозиготном состоянии с описанной ранее нонсенс-мутацией *c.1743C>G*, *p.Y581** у ребенка с синдромом Гурлер. Делеция *c.1238_1264del*, вызывающая делецию девяти аминокислотных остатков *p.D413_L421del*, была обнаружена в компаунд-гетерозиготном состоянии с нонсенс-мутацией *c.208C>T*, *p.Q70** у пациента с тяжелым фенотипом. Делеция 16 и вставка трех нуклеотидов *c.1873_1888delinsACA* приводит к сдвигу рамки считывания *p.Y625Tfs*?*, однако терминация трансляции приходится на точку, находящуюся за пределами стоп-кодона референсной последовательности гена. Эта мутация была выявлена у двух пациентов: в компаунд-гетерозиготном состоянии с миссенс-мутацией *c.1139A>G*, *p.Q380R* у пациента с мягким фенотипом болезни, соответствующим синдрому Шейе, и у пациента с делецией 12 нуклеотидов *c.46_57del*, *p.S16_A19del*, фенотип которого неизвестен. Не описанный ранее миссенс-вариант *c.1459T>C*, *p.W487R* был выявлен дважды в компаунд-гетерозиготном состоянии с нонсенс-вариантами *c.1898C>A*, *p.S633**, описанными недавно в единственном исследовании [381] и *c.208C>T*, *p.Q70** у двух детей с тяжелым фенотипом. Патоген-

ность этого миссенс-варианта предсказывается по всем использованным в настоящей работе биоинформатическим ресурсам. При этом совместное носительство этих вариантов определяет фенотип ребенка, соответствующий описанию синдрома Гурлер, с биохимически подтвержденным значительным дефицитом α -L-идурунидазы. Функциональное значение нонсенс-варианта *c.1898C>A*, *p.S633** согласуется с наличием нескольких описанных ранее мутаций, расположенных в С-концевой области гена [129, 823]. Эти варианты приводят к усечению некаталитического (Ig-подобного) домена белка. Этот домен необходим для стабильности белка и может также способствовать ориентации субстрата [148]. Миссенс-вариант *c.718C>G*, *p.H240D*, расположенный в области связывания субстрата, был обнаружен в компаунд-гетерозиготном состоянии с мутацией *c.1044C>G*, *p.N348K*, описанной ранее у пациентов с мягким фенотипом. Ребенку с сочетанием этих вариантов был выставлен диагноз Гурлер–Шейе, как и ребенку с новым миссенс-вариантом *c.1595T>G*, *p.L532R*, выявленным нами в компаунд-гетерозиготном состоянии с мутацией *c.208C>T*, *p.Q70**. Не описанный ранее вариант *c.1688A>C*, *p.Q563P* гена *IDUA* был выявлен нами в гомозиготном состоянии у двадцатилетнего пациента с мягким фенотипом и незначительным снижением α -L-идурунидазы, которому впоследствии был выставлен диагноз синдром Шейе. Нуклеотидная замена *c.1709A>T*, приводящая к замене аминокислотных остатков *p.A570V*, была выявлена в гомозиготном состоянии у двух сибсов в возрасте 8 и 9 лет с мягким фенотипом МПС I, которым был выставлен синдром Шейе, и у одного пятилетнего ребенка с синдромом Гурлер–Шейе в компаунд-гетерозиготном состоянии с мутацией *c.1598C>T*, *p.P533L*, описанной ранее у двух российских пациентов с тяжелым и мягким фенотипом МПС I [996].

Для большинства мутаций, перечисленных в базе HGMD, не описана четкая корреляция генотипа и фенотипа. Однако были описаны мутации, надежно прогнозирующие фенотип тяжелого течения болезни [129, 137, 234, 893, 927, 996, 1004]. В нашем исследовании 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. При этом варианты *p.T293_Y296dup*, *p.Q380R*, *p.A570V* и *p.Q563P* ассоциированы с формированием мягкого фенотипа.

Возрастные медианы возникновения симптомов, постановки диагноза МПС I и начала ФЗТ, вычисленные в соответствии с фенотипом пациентов и отнесенные к различным подтипам МПС I, представлены на рис. 20. Для трех пациентов информация о подтипе МПС I отсутствует.

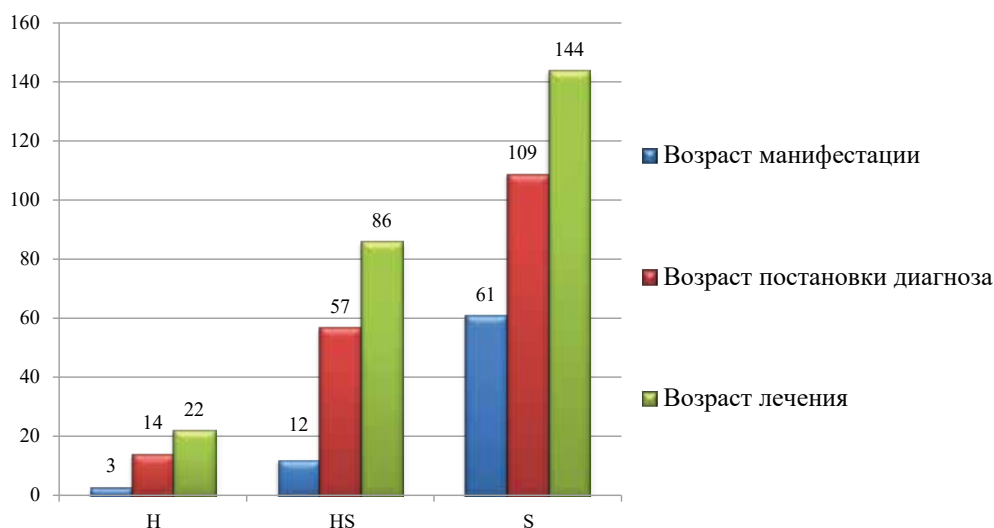


Рис. 20. Медианные значения возрастных характеристик пациентов с синдромами Гурлер (H), Гурлер–Шейе (H-S) и Шейе (S) указаны в месяцах с момента рождения

Медианный возраст регистрации первых симптомов у пациентов с синдромом Гурлер составляет 3 месяца, возраст постановки диагноза составляет 1 год и 2 месяца, а возраст начала терапии – 1 год и 10 месяцев. При этом возрастные характеристики пациентов с синдромом Гурлер–Шейе, демонстрирующие более мягкую клиническую картину болезни, превосходят эти значения приблизительно в 4 раза: 1 год, 4 года и 9 месяцев, 7 лет и 2 месяца соответственно. Особенно обращает на себя внимание значительный временной интервал между возрастом появления симптомов и постановкой диагноза, составляющий почти 5 лет. Значения возрастных медиан манифестации симптомов, постановки диагноза и начала терапии для обследованных нами пациентов с синдромом Шейе составляют 5 лет и 1 месяц, 9 лет и 1 месяц, 11 лет и 10 месяцев соответственно. Полученные нами цифры совпадают с данными, полученными в Северной Америке, и отличаются от медианного возраста начала лечения у пациентов с синдромом Шейе в Европе (16,9 лет), Южной Америке (17,7 лет) и Азиатско-Тихоокеанском регионе (31,5 лет). Медианный возраст начала лечения российских пациентов с синдромом Гурлер–Шейе почти совпадает со средним показателем по миру (8 лет), но гораздо ниже, чем в Азиатско-Тихоокеанском регионе (23,8 лет). Начало терапии большинства российских пациентов с синдромом Гурлер, для которых это имеет особую важность, незначительно отстает от медианных американских (1,3 года) и европейских (1,4 года) показателей, при этом азиатские (2 года) и латиноамериканские (3,6 года) возрастные медианы начала терапии [127], в свою очередь, отстают от российских.

Представленные возрастные характеристики обследованных больных, а также значения ферментативной активности демонстрируют достоверные различия между тремя подтипами МПС I (табл. 21).

Таблица 21. Возрастные и ферментативные особенности российских пациентов с различными подтипами МПС I

Показатель	Гурлер	Гурлер-Шейе	Шейе	р-значение (медианный тест)
Возраст манифестации, лет	3 (1–5)	9 (3,5–34,5)	24 (12–24)	<0,001
Значение активности фермента, мкмоль/л/ч	0,245 (0,17–0,37)	1,03 (0,93–1,04)	1,18 (1,03–1,45)	<0,001

Примечание. Возрастные и биохимические характеристики представлены значениями медианы и квартилями распределения признаков (25–75%).

Представленные данные указывают на то, что применение критерия Манна-Уитни для обсчета возраста манифестации и значений активности фермента позволит выявить достоверные корреляции возрастных и биохимических характеристик с различными подтипами МПС I (табл. 22).

Таблица 22. Расчет корреляций (U-критерий Манна-Уитни) возраста манифестации и ферментативной активности с различными подтипами МПС I у российских пациентов

Показатель	S	Остальные		H-S	Остальные		H	Остальные				
		p	p*		p	p*		p	p*			
Возраст манифестации, лет	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/ч	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. 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%).



Таким образом, среди обследованных российских пациентов с МПС I дети с синдромом Гурлер имеют достоверные отличия от других подтипов по возрасту манифестации болезни ($p=0,005$) и значению ферментативной активности ($p<0,001$). Пациенты с синдромом Шейе имеют достоверные отличия от остальных подтипов по возрасту манифестации ($p=0,016$) и по значению ферментативной активности ($p=0,018$).

Изучение возрастных характеристик пациентов с различными подтипами МПС I позволило установить строгую ассоциацию мажорного генотипа $p.Q70^*/p.Q70^*$ у детей, больных синдромом Гурлер, с манифестацией болезни в возрасте до 3 месяцев $p<0,001$ (табл. 23). При этом российские пациенты с МПС I, обладающие таким генотипом, имеют повышенный риск манифестации болезни в возрасте до 3 месяцев ОШ=27,5 (ДИ 3,2–233,5) по сравнению с любыми другими мутациями гена *IDUA*.

Таблица 23. Расчет ассоциации возраста манифестации МПС I с генотипом $p.Q70^*/p.Q70^*$

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

1.1.3.1.5. Оптимизация алгоритма генетической диагностики мукополисахаридоза, тип I

После расположения выявленных мутаций на карте гена *IDUA*, стало очевидно, что наибольшее разнообразие вариантов (5/18%) было обнаружено в экзоне 8, тогда как в экзонах 3 и 4 не было найдено ни одной мутации (рис. 21). Мутация $c.208C>T$, $p.Q70^*$, обнаруженная с долей 47,8%, позволяет оптимизировать алгоритм молекулярно-генетической диагностики МПС, тип I у российских пациентов.

Таким образом, при получении лабораторией дегидратированных пятен крови, изъятых у российских пациентов с подозрением на МПС I, может быть предложен следующий алгоритм генетической диагностики:

1) измерение ферментативной активности α -L-идуронидазы методом МС/МС;

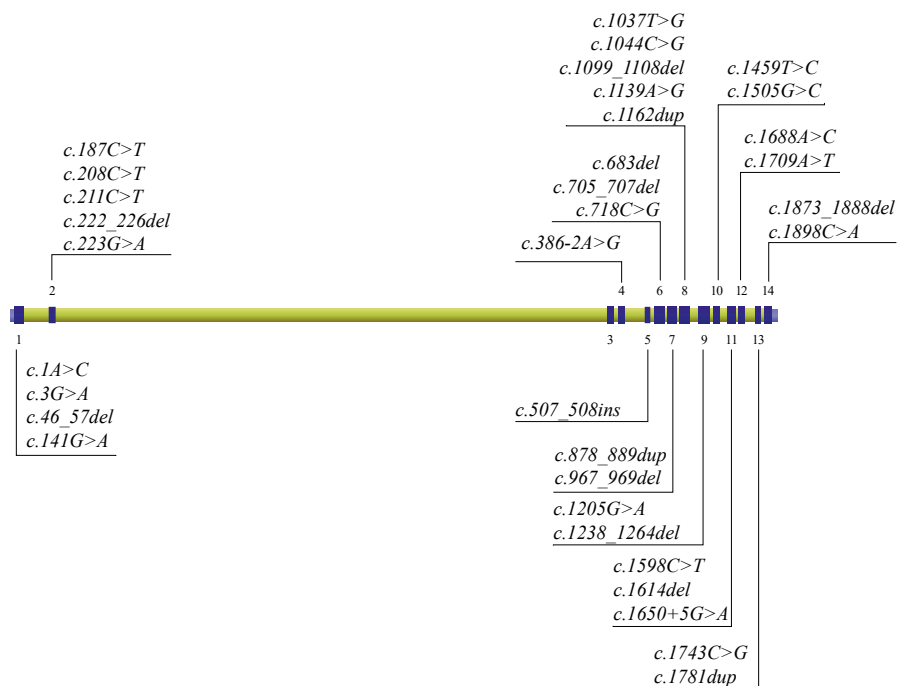


Рис. 21. Структура гена *IDUA* (NM_000203.3) и распределение мутаций, выявленных в ходе проведенного исследования

2) в случае сниженной активности α -L-идуронидазы и нормального значения активности контрольного фермента – 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*.

1.1.3.1.6. Выводы

Разработанный метод ферментативной диагностики МПС I позволил осуществить селективный скрининг 4940 пациентов с подозрением на МПС I и выявить 38 (0,77%) новых случаев болезни, тогда как разработанный метод молекулярно-генетической диагностики гена *IDUA* позволил подтвердить эти случаи путем обнаружения мутаций, а также способствовал выявлению патогенных вариантов у 16 пациентов, обнаруженных ранее посредством биохимического анализа. Результаты дальнейшей научной работы позволили описать возрастные, географические и генотип-фенотипические характеристики 54 российских пациентов с МПС I. Описана клиническая картина пациентов, страдающих МПС I, по 14 различным параметрам. Определена распространен-

ность различных подтипов МПС I среди пациентов из обследованной когорты. Доля пациентов с МПС, тип IH составила 70,6%, с МПС, тип IH-S – 15,7%, с МПС, тип IS – 13,7%. Вычислены медианные значения возраста: манифестации, постановки диагноза и начала терапии пациентов с синдромами Гурлер, Гурлер–Шейе и Шейе. Определены субъекты РФ с преимущественным распространением пациентов с МПС I. Выявлен спектр и относительные частоты 33 различных вариантов гена *IDUA*, среди которых обнаружена мажорная мутация *p.Q70**, характерная для российских больных, на основе чего была предложена оптимизация алгоритма генетической диагностики МПС I. Описаны мутации, обнаружение которых позволяет прогнозировать развитие тяжелого и мягкого фенотипа среди российских пациентов с МПС I. 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). Кроме того, 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) ($p<0,001$). Впервые описаны 17 не описанных ранее патогенных вариантов гена *IDUA*, что пополняет базу HGMD на 6,2%, и подтипы МПС I, вызываемые этими вариантами у обследованных нами пациентов.

1.1.3.2. Мукополисахаридоз, тип II

МПС, тип II (синдром Хантера), OMIM 309900 – редкое наследственное заболевание, причиной возникновения и развития которого служат мутации гена *IDS*, OMIM 300823, кодирующего идуронат-2-сульфатазу, сниженная активность которой приводит к накоплению гепарансульфата и дерматансульфата в большинстве клеток организма [568]. Это панэтническое заболевание со средней частотой в мире, оцениваемой как 1 случай на 77 000 живых новорожденных мальчиков [1035]. Частота заболевания в различных развитых странах варьирует: от 1 случая на 34 000 живых рождений в Израиле [837] до 1 случая на 140 000–330 000 живых новорожденных в Германии и Нидерландах [836]. Тип наследования болезни X-сцепленный рецессивный. А значит, основными факторами риска развития синдрома Хантера являются семейная история и половая принадлежность. Кроме того, мутации могут возникать спонтанно. Единичные, спорадически возникшие случаи, описаны и у девочек [953], при этом у девочек описаны случаи развития синдрома Хантера, связанные в том числе с лайонизацией X-хромосомы [249, 503], что не характерно для этой болезни, в отличие от БФ.



МПС, тип II впервые был описан шотландским врачом Чарльзом Хантером в 1917 году в Королевском обществе собрания медицины в Лондоне на примере истории болезни двух братьев [481]. В основе патогенеза синдрома Хантера лежат патогенные изменения референсной последовательности нуклеотидов гена *IDS*, длиной почти 57 т.п.н., состоящего из 9 экзонов, картированного на длинном плече X-хромосомы в области Xq28, кодирующего белок длиной 550 аминокислотных остатков с молекулярной массой 61873 кДа. К настоящему времени описано 648 патогенных вариантов этого гена [471], 15% которых приходится на структурные перестройки с псевдогеном, расположенным поблизости, и на крупные делеции отдельных частей гена вплоть до тотальной делеции гена и соседней хромосомной области [544]. Нерасщепленные ввиду ферментативного блока гликозаминогликаны накапливаются в лизосомах органов и тканей, что и приводит к характерным фенотипическим проявлениям описываемой болезни по мере прогрессирования этого накопления. Причем степень проявления признаков накопления зависит от спектра мутаций гена *IDS*. Наиболее значимые структурные изменения ДНК, такие как нонсенс-мутации, перестройки и делеции гена, мутации со сдвигом рамки считывания, как правило, выявляют при тяжелой форме болезни [190].

Заболевание условно разделяют на тяжелую и легкую формы в зависимости от возраста манифестации, тяжести неврологической симптоматики и выживаемости [1035]. Тяжелая форма манифестирует между 18 месяцами и 4 годами и, постоянно прогрессируя, приводит к глубокой умственной отсталости, сопровождаясь неврологическими нарушениями, глухотой и соматической дисфункцией [636]. Для этой формы характерно замедление роста, постепенно развивающееся после 3 лет, с удлинненными конечностями относительно укороченного туловища. Аномальная пигментация сетчатки глаза и папиллоэдема. Отмечается изменение черт лица по типу гаргоилизма, признаки множественного костного дизостоза, огрубление и утолщение кожи, прогрессирующее снижение интеллекта [1035]. Изменения кожи являются практически патогномичными для этого заболевания. Гипертрихоз и папулезные поражения кожи (монголоидные пятна цвета слоновой кости) встречаются в форме сетчатой структуры между лопатками и задней подмышечной линии, а также в грудной области и в области шеи [734]. Нарушения функции органов пищеварения проявляются в виде гепатомегалии и хронической диареи. Среди неврологических нарушений преобладают симптомы прогрессирующей сообщающейся гидроцефалии, спастической параплегии и прогрессирующей тугоухости. У детей с синдромом Хантера отмечается тугоподвижность крупных и мелких суставов. Прогрессируют сердечные и легочные расстройства [385].

Более легкая форма синдрома может быть заподозрена в позднем подростковом и юношеском возрасте. Интеллектуальные способности могут быть снижены незначительно, но с нарушениями чтения и вербальных навыков. У большинства пациентов в развитие заболевания вовлечен лишь один орган [910]. Физические особенности аналогичны тяжелой форме, по принципу, но не по тяжести; зачастую сопровождаются дисплазией тазобедренных костей и/или небольших костей запястья, а также ранним остеоартритом [385].

Проблемы поведения, такие как агрессия, беспокойство и нарушения сна, характерны для обеих форм синдрома Хантера.

Смерть наступает, как правило, в результате кардиореспираторных осложнений для тяжелой формы в среднем в возрасте 12 лет, для мягкой формы в среднем в возрасте 21,7 года [500].

Раннее выявление заболевания и соответствующий междисциплинарный подход к комплексному патогенетическому лечению значительно улучшает качество жизни и увеличивает ее продолжительность [788]. Поэтому методы диагностики должны обладать чувствительностью и специфичностью, достаточной для постановки точного диагноза в максимально сжатые сроки. К скрининговым методам лабораторной диагностики всех типов МПС и синдрома Хантера, в частности, относятся качественное и количественное определение накопленных организмом ГАГ в экскретируемой моче. Однако методы тестирования ГАГ могут давать ложноотрицательные результаты, что связано с недостатком чувствительности метода [636]. Золотым стандартом диагностики синдрома Хантера по-прежнему считают измерение активности идурунат-2-сульфатазы в лейкоцитах крови [836]. Но в развитых странах все чаще биохимическую диагностику МПС проводят с помощью ТМС по причине возможного мультиплексирования исследования и удобства перевозки и хранения биологического материала в виде пятен крови, высушенных на фильтровальной бумаге [385]. Именно ТМС используют и при проведении скрининга новорожденных на различные типы МПС, причем в настоящее время разработаны мультиплексные системы определения сниженной активности различных типов МПС в одной постановке [894]. Это может существенно сэкономить время при невозможности заподозрить конкретный тип МПС на основании клинической картины. При сниженной активности идурунат-2-сульфатазы необходимо исключать множественную сульфатазную недостаточность, похожую клинически на метахроматическую лейкодистрофию и синдром Гурлер, которые сопровождаются снижением активности сульфатаз [643].

Для проведения молекулярно-генетической диагностики используют ПЦР и дальнейшее таргетное секвенирование всех значимых

фрагментов гена *IDS*, включая пограничные области экзонов и интронов, что позволяет выявить приблизительно 82% патогенных вариантов гена (65% – точечные и сплайсинговые, 17% – небольшие делеции и инсерции). В случае невыявления используют метод MLPA для поиска делеций и дупликаций, на которые приходится приблизительно 9% всех мутаций. В случае невыявления мутаций обоими методами используется количественная ПЦР и Саузерн-блот для поиска перестроек, происходящих из-за рекомбинации с псевдогеном либо по другой причине, на долю которых приходится оставшиеся 9% мутаций. Среди описанных к настоящему времени мутаций не существует частых вариантов, свойственных той или иной популяции либо заболеванию в целом. Кроме того, одни и те же мутации выявляются у пациентов с тяжелым и мягким течением болезни, что указывает на вклад других факторов, модифицирующих фенотип [489]. Несмотря на то, что нет строгих фенотипических корреляций, пациенты с протяженными делециями гена и крупными хромосомными перестройками, как правило, имеют более тяжелую клиническую картину болезни [944].

На сегодняшний день наиболее распространенной в мире патогенетической терапией синдрома Хантера является пожизненная ФЗТ Элапразой (Elaprase®, Shire Human Genetic Therapies, Inc., Cambridge, MA), которая была одобрена Комитетом по контролю за продуктами и лекарствами (FDA) США в качестве орфанного препарата в июле 2006 года. Этот препарат не может вылечить болезнь, он может существенно улучшить качество жизни больным детям [235]. Однако, несмотря на принятые руководства, в которых утверждается, что ФЗТ следует рекомендовать пациентам с мягким фенотипом в возрасте старше 5 лет, специалисты все чаще убеждаются в том, что ФЗТ следует начинать как можно раньше любым пациентам, страдающим МПС II [385], так как это приводит к заметному замедлению или предотвращению развития некоторых необратимых проявлений синдрома Хантера, включая огрубление черт лица, болезни суставов и сердца [954]. В настоящее время разрабатываются методы скрининга новорожденных для идентификации пациентов, которым ФЗТ принесет максимально возможную пользу до появления необратимых повреждений органов и тканей [654].

Трансплантация костного мозга (ТКМ) является еще одним методом лечения синдрома Хантера. Факторы, влияющие на исход лечения пациента, включают в себя тяжесть клинической картины, генотип донора, а также возраст пациента. Результаты исследования Vellodi с коллегами показали, что из 16 пациентов с трансплантированным костным мозгом 15 продолжили демонстрировать заметное ухудшение интеллектуальных особенностей [985]. Кроме того, разрабатываются подходы, позволяющие терапевтическим белкам проникать через

гематоэнцефалический барьер, посредством интратекального введения [293] либо при помощи слитых белков [602].

Помимо методов лечения, описанных выше, активно разрабатываются механизмы генной терапии, с успехами которой связаны большие надежды [685].

Ввиду продолжающихся споров о целесообразности существующей патогенетической терапии и слабой зависимости ее эффективности от ранней диагностики наше внимание было сконцентрировано на решении аналитической задачи, направленной на изучение и описание клинических и генетических особенностей развития болезни в российской популяции. Именно большая выборка пациентов с МПС II, проанализированных генетически и клинически, способна охарактеризовать российские популяционные особенности и может иметь фундаментальное значение для разработки новых технологий лечения болезни, существенно дополнив имеющиеся в мировом сообществе данные.

1.1.3.2.1. Клинические, географические и генетические особенности синдрома Хантера

Для оценки клинических, географических и генетических особенностей развития МПС, тип II в РФ нами были обследованы 91 пациент из 86 неродственных семей, населяющих 35 субъектов РФ в среднем возрасте 11 лет (стандартное отклонение 8 лет 9 месяцев), медиана 9 лет (от 11 месяцев до 45 лет) на момент проведения исследования. У всех обследованных пациентов диагноз был заподозрен на основе определенных клинических признаков, манифестировавших в среднем в возрасте 1 года и 1 месяца, медиана 11 месяцев. Средний возраст постановки диагноза составил 6 лет и 10 месяцев, медиана 3 года и 9 месяцев. Возрастные характеристики устанавливались на основе биохимической и молекулярно-генетической диагностики 35 новых пациентов с синдромом Хантера, а также информации о биохимической диагностике из историй болезни 56 пациентов, выявленных ранее. Средний возраст начала ФЗТ составил 7 лет, медиана 5 лет и 1 месяц. Все пациенты за исключением девяти, в том числе двух, погибших в возрасте 17 и 45 лет, не лечились посредством ФЗТ на момент окончания исследования. Информация о ФЗТ восьми пациентов недоступна. Остальные пациенты получают ФЗТ в течение временного отрезка протяженностью от 2 месяцев до 9 лет и 9 месяцев на момент окончания исследования.

Географические особенности синдрома Хантера удалось установить для 75 (87,2%) отягощенных семей из 86 обследованных (табл. 24).

Таблица 24. Распределение обследованных нами семей, отягощенных МПС II, в различных субъектах РФ

Субъект	Численность населения	Число семей	Частота в субъекте*
Москва	12 615 882	16	1:788 493
Московская область	7 599 756	5	1:1 519 951
Нижегородская область	3 214 657	5	1:642 931
Иркутская область	2 397 832	3	1:799 277
Ленинградская область	1 813 816	3	1:604 605
Пермский край	2 610 800	3	1:870 267
Алтайский край	2 332 511	3	1:777 504
Республика Башкортостан	4 051 005	2	1:2 025 503
Чувашская Республика	1 223 395	2	1:611 698
Курская область	1 107 041	2	1:553 521
Ростовская область	4 202 337	2	1:2 101 169
Свердловская область	4 315 702	2	1:2 157 851
Санкт-Петербург	5 383 968	2	1:2 691 984
Тамбовская область	1 015 981	2	1:507 991
Республика Татарстан	3 898 700	2	1:1 949 350
Чеченская Республика	1 456 951	2	1:728 476
Республика Адыгея	454 762	1	1:454 762
Омская область	1 944 225	1	1:1 944 225
Амурская область	793 194	1	1:793 194
Владимирская область	1 365 825	1	1:1 365 825
Воронежская область	2 327 843	1	1:2 327 843
Республика Дагестан	3 085 738	1	1:3 085 738
Кабардино-Балкарская Республика	866 310	1	1:866 310
Калужская область	1 009 377	1	1:1 009 377
Кировская область	1 272 133	1	1:1 272 133
Новосибирская область	2 793 389	1	1:2 793 389
Оренбургская область	1 963 007	1	1:1 963 007
Приморский край	1 902 719	1	1:1 902 719
Ставропольский край	2 795 103	1	1:2 795 103
Томская область	1 077 442	1	1:1 077 442
Тюменская область	3 723 984	1	1:3 723 984
Удмуртская Республика	1 507 390	1	1:1 507 380
Республика Крым и Севастополь	2 355 027	1	1:2 355 027
Хабаровский край	1 321 496	1	1:1 321 496
Челябинская область	3 475 727	1	1:3 475 727

Примечание. * На основе выборки пациентов, обследованных в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

Все выявленные семьи с МПС II распределились по 35 (40,7%) субъектам РФ с преобладанием в Москве (16/21,3%), Московской и Нижегородской областях (по 5/6,7%). Значительный процент выявляемых случаев в этих трех субъектах РФ может указывать как на высокую плотность населения, так и на высокий уровень осведомленности врачей-педиатров, проявляющих настороженность и отправляющих пациентов на консультацию к врачу-генетику либо сразу на лабораторную диагностику.

При переходе на уровень федеральных округов становится очевидно, что почти две трети всех обследованных семей проживают в Центральном федеральном округе (28/37,3%) и Приволжском федеральном округе (17/22,7%) (табл. 25).

Таблица 25. Распределение семей, отягощенных МПС II, в различных федеральных округах

Федеральный округ	Численность населения	Число семей	Частота в округе
Центральный	39 378 947	28	1:1 406 391
Приволжский	29 397 227	17	1:1 729 249
Сибирский	17 173 185	10	1:1 717 319
Северо-Кавказский	9 866 370	6	1:1 644 395
Северо-Западный	13 972 061	5	1:2 794 412
Южный	16 454 580	3	1:5 484 860
Уральский	12 350 131	3	1:4 116 710
Дальневосточный	8 188 594	3	1:2 729 531

Примечание. На основе выборки пациентов, обследованных в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

Частоты встречаемости различных клинических проявлений синдрома Хантера удалось оценить у 59 (64,8%) обследованных пациентов на момент первой госпитализации в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России по 15 различным параметрам (рис. 22).

У 95–98% обследованных детей диагностировались грыжи, грубые черты лица по типу «гаргоилизма» и частые ОРВИ. Храп, шумное дыхание и множественный дизостоз описывались у 90–93% детей. Задержка психоречевого развития, гепатоспленомегалия и синдром апноэ во сне выявлялись у 81–85% детей. Аномалии клапанов сердца, кардиомиопатия, макроглоссия и карпальный туннельный синдром диагностировались у 75–76% пациентов. Помутнение роговицы, дементный синдром и стеноз шейного отдела позвоночника были обнаружены у 53–59% пациентов. Лишь у 17% детей была описана дисплазия тазобедренных

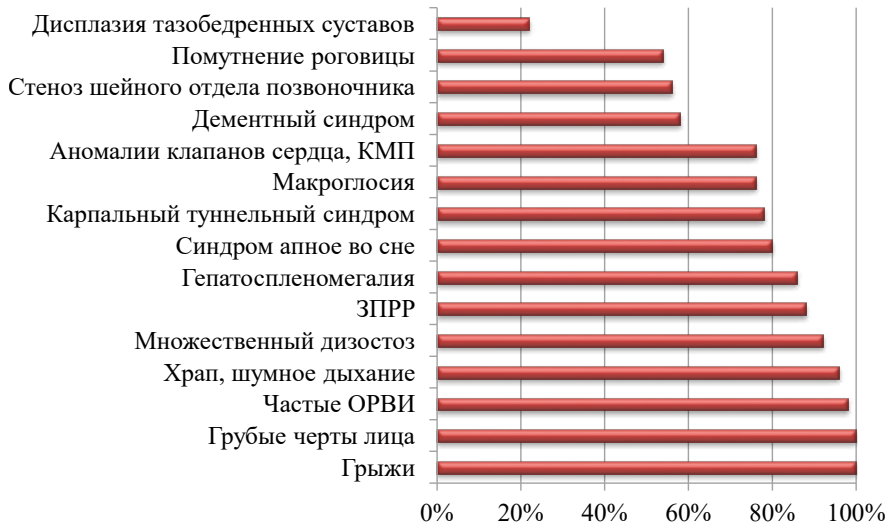


Рис. 22. Частоты различных клинических проявлений синдрома Хантера среди описываемых пациентов

суставов. Фенотип обследованных нами пациентов в целом сочетается с исследованиями, проведенными другими научными группами [836].

Для оценки относительных частот и спектра мутаций, приводящих к развитию МПС II, было проведено молекулярно-генетическое исследование 91 пациента с МПС II из 86 неродственных семей.

Сложность молекулярно-генетической диагностики болезни Хантера состоит в наличии гомологичного псевдогена *IDS2*, расположенного рядом с геном *IDS*, патогенные рекомбинации между которыми могут достигать 13% всех описанных случаев развития МПС II [166]. Анализ полученных в ходе нашего исследования данных выявил 64 различных патогенных варианта, явившихся причиной развития синдрома Хантера у обследованных пациентов (рис. 23).

Анализ полученных данных указывает на практически равномерное распределение различных мутаций среди 86 неродственных российских семей, обследованных нами, и отсутствие мажорных вариантов [230, 830], что характерно для наследственных болезней с X-сцепленным типом наследования. У шести пациентов (7,0%) встречались рекомбинации между геном *IDS* и псевдогеном *IDS2*. В трех неродственных семьях (3,5%) встретились: синонимичная нуклеотидная замена *c.1122C>T*, *p.G374G*, приводящая к образованию нового сайта сплайсинга [451], три миссенс-мутации: *c.1403G>A*, *p.R468G*; *c.253G>A*, *A85T*; *c.257C>T*, *p.P86L* и нонсенс-мутация *c.514C>T*, *p.R172**. Миссенс-мутации: *c.325T>C*, *p.W109R*; *c.590C>T*, *p.P197L*; *c.795C>A*, *p.N265K*, а также делеции: *c.410_411del*, *p.Phe137Serfs*7*; *IDSdel* и нонсенс-мутации: *c.998C>A*, *p.S333**, *c.1327C>T*, *p.R443** встретились в двух семьях. Остальные мутации встретились в единичных семьях.

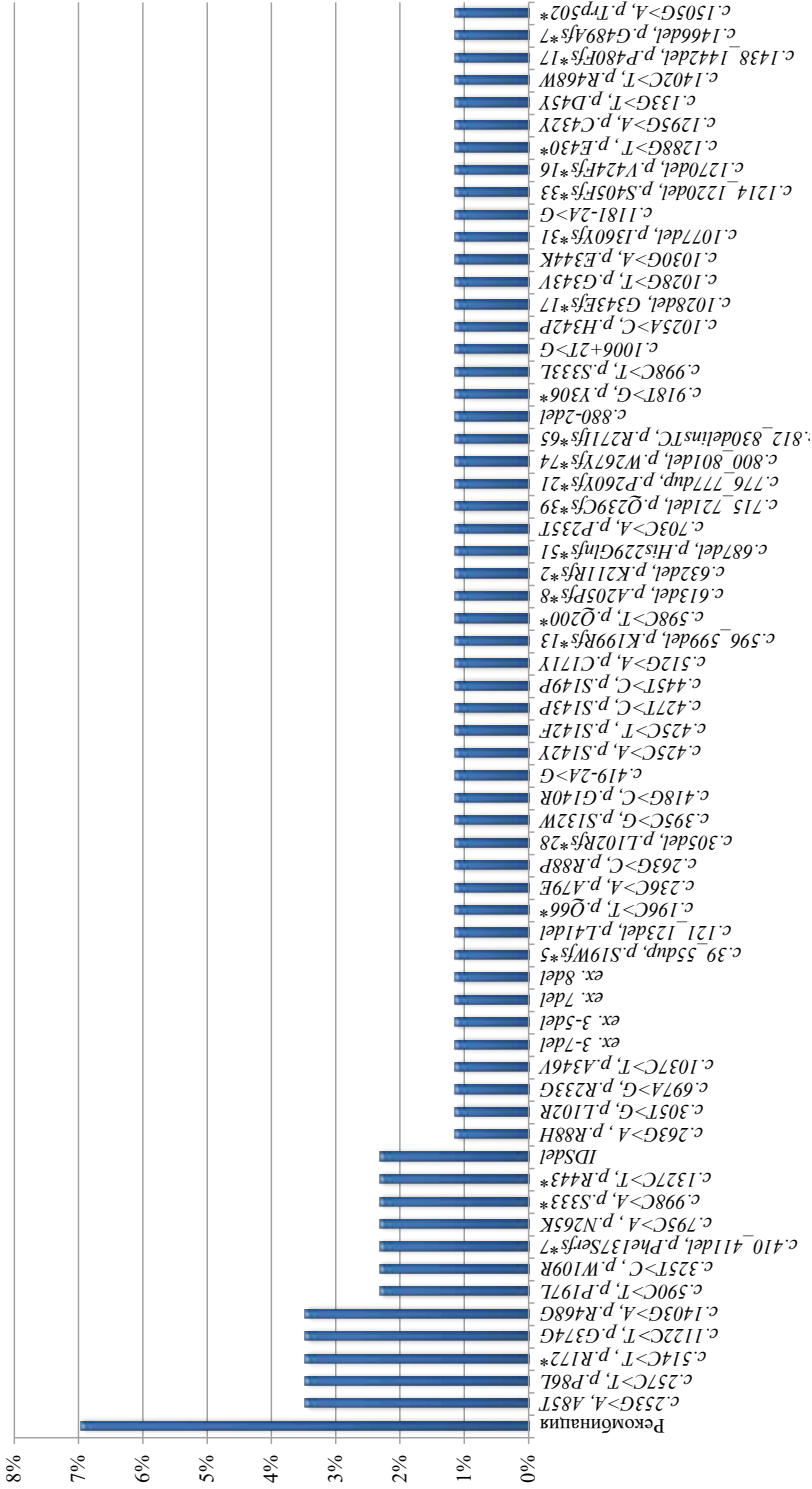


Рис. 23. Относительные частоты и спектр мутаций, явившихся причиной развития синдрома Хантера в 86 неродственных российских семьях

Все выявленные мутации в целом равномерно распределены по всем девяти экзонам гена *IDS* с наибольшим разнообразием в экзоне 3 и прилегающих интронах (11/17,2%) и наименьшим – в экзоне 1 (1/1,6%) (рис. 24).

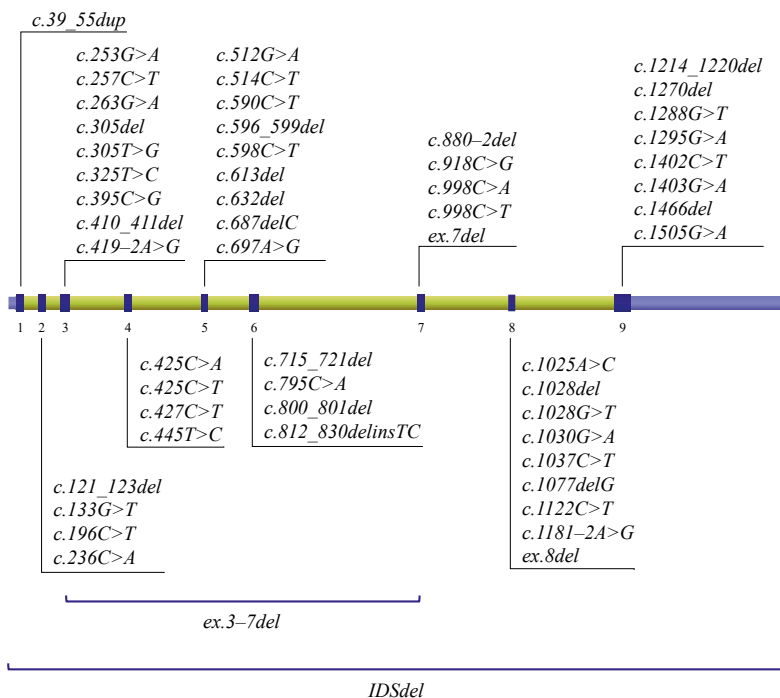


Рис. 24. Структура гена *IDS* (NM_000202.5) и распределение мутаций, выявленных в ходе проведенного исследования

Анализ сегрегации обнаруженных вариантов, который удалось провести лишь в 48 (55,8%) обследованных семьях, позволил определить спонтанность возникновения мутаций в 25,0% случаев, тогда как 75,0% пациентов унаследовали мутации от родных матерей. При этом семейные случаи синдрома Хантера описаны в историях болезней менее 50,0% пациентов, что может свидетельствовать о недостаточной осведомленности медицинских работников, составлявших истории болезни, либо о спорадическом возникновении мутаций у матерей обследованных нами пациентов, либо об отсутствии живорожденных мальчиков по женской линии родства. Литературные данные указывают на схожие частоты мутаций *de novo* [765].

Среди обнаруженных в ходе проведенного исследования 64 различных мутаций преобладали миссенс-мутации – 27 (42,2%), вторыми по частоте оказались небольшие делеции и вставки со сдвигом рамки

считывания – 18 (28,1%), на нонсенс-мутации, протяженные делеции, инверсии, мутации, нарушающие сплайсинг, а также на делеции, не приводящие к сдвигу рамки считывания, в общей сложности пришлось 19 (29,7%) различных вариантов (рис. 25).

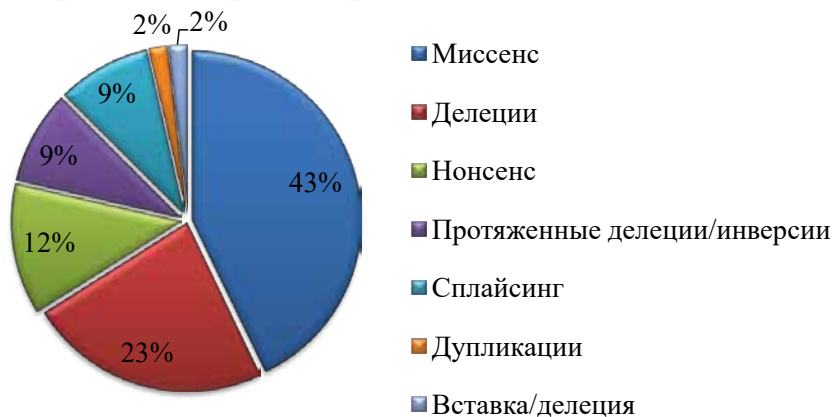


Рис. 25. Доли различных типов мутаций у 91 обследованного пациента с синдромом Хантера

1.1.3.2.2. Генотип-фенотипические корреляции

«Количественные» мутации, укорачивающие кодируемый белок, составили 50% от числа различных патогенных вариантов, обнаруженных нами, при этом они были выявлены у 42 (46,2%) пациентов с синдромом Хантера. Для проверки связи выявленных нами мутаций с фенотипом обследованных пациентов мы вычислили ассоциацию мутаций, укорачивающих кодируемый белок, с возрастом манифестации синдрома Хантера и с грубой задержкой психоречевого развития. Ни в том, ни в другом случае достоверной связи выявлено не было ($p > 0,05$). При этом другими исследователями были обнаружены достоверные ассоциации генотипа с фенотипическими проявлениями болезни в случае протяженных делеций/инсерций гена *IDS*, а также перестроек между геном *IDS* и псевдогеном *IDS2* [190, 993], что нам рассчитать не удалось ввиду малочисленности таких пациентов.

Кроме того, были оценены различия в фенотипических проявлениях синдрома Хантера в группах пациентов с различной тяжестью интеллектуальной инвалидности, которая определялась двумя лечащими врачами на основе школьной успеваемости и/или уровня образования, поведения и оценки IQ выше или ниже 70 на момент последней госпитализации в наш Центр. Нормальная успеваемость / уровень образования, поведение и $IQ > 70$ соответствовали отсутствию интел-

лектуальной инвалидности («-»), однако таких пациентов описать не удалось. Отклонение от нормы по этим пунктам, характеризующим интеллектуальную инвалидность, обозначалось следующим образом: «+» – мягкое, «++» – среднее и «+++» – тяжелое отклонение от нормы. Достоверные различия в этих группах были выявлены у пациентов с аномалиями клапанов сердца, КМП ($p=0,005$) и карпальным туннельным синдромом ($p=0,023$). Задержка психоречевого развития и синдром апноэ во сне имели тенденцию к достоверным различиям между группами. Остальные различия не были достоверными (табл. 26).

Таблица 26. Фенотипические проявления пациентов с различной тяжестью интеллектуальной инвалидности

Показатель	Число пациентов, %			р-значение (критерий Краскела- Уоллиса)
	«+»	«++»	«+++»	
Грыжи	9	20	16	0,544
Грубые черты лица	9	21	16	0,612
Макроглосия	8	14	14	0,217
Множественный дизостоз	9	19	14	0,558
Дисплазия тазобедренных суставов	1	4	2	0,803
Апноэ во сне	5	18	15	0,047
Храп, шумное дыхание	8	21	16	0,122
Гепатоспленомегалия	6	20	14	0,103
Помутнение роговицы	4	10	12	0,180
Аномалии клапанов сердца, КМП	4	16	16	0,005
Карпальный туннельный синдром	4	18	14	0,025
ЗПРР	6	18	16	0,058
Стеноз шейного отдела позвоночника	5	12	10	0,927
Частые ОРВИ	9	21	16	0,988

Выявленные различия были обчислены с помощью критерия Фишера, что позволило обнаружить ассоциацию аномалий клапанов сердца и/или КМП ($p=0,015$) и карпального туннельного синдрома ($p=0,015$) со средней и тяжелой степенью интеллектуальной недостаточности (табл. 27).

При этом носители средней и тяжелой степени интеллектуальной недостаточности имеют восьмикратное превышение риска развития аномалий клапанов сердца и КМП и карпального туннельного синдрома ОШ=7,5 (ДИ 1,2–53,9) по сравнению с пациентами с легкой степенью интеллектуальной инвалидности.

Таблица 27. Расчет ассоциации развития аномалии клапанов сердца и/или КМП и карпального туннельного синдрома у пациентов с различной степенью интеллектуальной инвалидности

Показатель	Число пациентов		p-значение (критерий Фишера)
	«+»	«++», «+++»	
Есть аномалии клапанов сердца, КМП	4	32	0,015
Нет аномалий клапанов сердца, КМП	5	5	
Есть карпальный туннельный синдром	4	32	0,015
Нет карпального туннельного синдрома	5	5	

Не выявив связи между мутациями, преждевременно прерывающими синтез кодируемого белка, возрастом манифестации синдрома Хантера и тяжестью умственной отсталости, было решено разбить обнаруженные мутации на классы по влиянию на белок и постараться найти различия между этими классами мутаций и их комбинациями и различными клиническими проявлениями, что позволило выявить ряд генотип-фенотипических корреляций. В частности, удалось обнаружить связь мутаций, сдвигающих рамку считывания, с развитием аномалии клапанов сердца и/или КМП (табл. 28).

Таблица 28. Расчет ассоциации мутаций гена *IDS*, сдвигающих рамку считывания, с развитием аномалии клапанов сердца и/или КМП у пациентов с синдромом Хантера

Показатель	Мутация, сдвигающая рамку считывания		р-значение (критерий Фишера)
	есть	нет	
Аномалии клапанов сердца и/или КМП	16	20	0,020
Нет аномалий клапанов сердца и/или КМП	1	12	

При этом вероятность того, что аномалии клапанов сердца и/или КМП разовьются у пациента с синдромом Хантера, обладающего мутацией, приводящей к сдвигу рамки считывания, превышает вероятность развития этого фенотипа у пациента с любой другой мутацией почти в 10 раз ОШ=9,3 (ДИ 1,1–434,5). Интересно отметить, что миссенс-мутации также ассоциированы с развитием аномалии клапанов сердца и/или КМП у пациентов с синдромом Хантера (табл. 29), только обладатели этих мутаций имеют пониженный риск развития этого фенотипического признака ОШ=0,12 (ДИ 0,01–0,67).

Таблица 29. Расчет ассоциации миссенс-мутаций гена *IDS* с развитием аномалии клапанов сердца и/или кардиомиопатии у пациентов с синдромом Хантера

Показатель	Миссенс-мутация		р-значение (критерий Фишера)
	есть	нет	
Аномалии клапанов сердца и/или КМП	14	22	0,008
Нет аномалий клапанов сердца и/или КМП	11	2	

Ни один другой тип мутаций не показал ассоциации ни с одним из фенотипических признаков, описанных выше, лишь протяженные делеции продемонстрировали тенденцию к ассоциации с аномалиями клапанов сердца и/или КМП, однако уровня необходимой значимости достигнуто не было.

1.1.3.2.3. Описание новых патогенных вариантов гена IDS

Не описанные до проведения нашего исследования в базе HGMD 29 вариантов гена *IDS*, составили 45,3% от числа всех обнаруженных нами мутаций, явившихся причиной развития МПС, тип II (рис. 26), встретившись у 33 пациентов, что составляет 36,3% всех исследованных нами случаев синдрома Хантера и может пополнить базу HGMD на 4,5%.

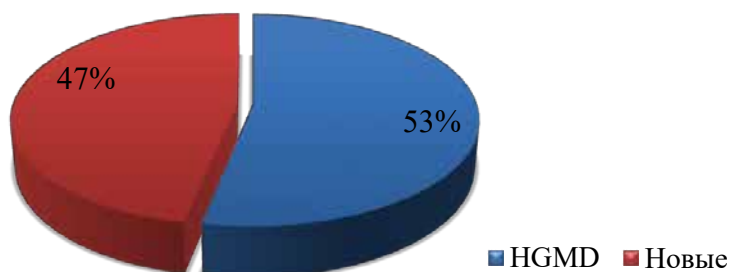


Рис. 26. Соотношение обнаруженных в ходе исследования в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России патогенных вариантов гена *IDS*, описанных и не описанных ранее в международной базе данных HGMD

Среди новых мутаций были выявлены восемь 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). Кроме того, были выявлены четыре 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), не описанные ранее. При этом мутации *c.590C>T*, *p.P197L* и *c.998C>A*, *p.S333** встретились дважды в неродственных семьях, проживающих в различных регионах. Все не описанные ранее мутации являются синглтонами. Клинические особенности течения синдрома Хантера у 20 пациентов с неописанными мутациями приведены в табл. 30.

1.1.3.2.4. Выводы

Значительная вариабельность 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 типом наследования, для которого, как было показано ранее на примере 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%. Кроме того, удалось описать фенотип пациентов с патогенными вариантами гена *IDS*, не описанными ранее. Выявлена достоверная ассоциация аномалий развития клапанов сердца и/или КМП ($p=0,015$), карпального туннельного синдрома ($p=0,015$) со средней и тяжелой степенью интеллектуальной недостаточности. При этом носители средней и тяжелой степени интеллектуальной недостаточности имеют почти восьмикратное превышение риска развития аномалий клапанов сердца и КМП, а также карпального туннельного синдрома ОШ=7,5 (ДИ 1,2–53,9) по сравнению с пациентами с легкой степенью интеллектуальной недостаточности. Кроме того, была обнаружена связь мутаций, сдвигающих рамку считывания и миссенс-мутаций с развитием аномалии клапанов сердца и/или КМП, при этом обладатели мутаций гена *IDS*, сдвигающих рамку считывания, имеют повышенный риск развития аномалий клапанов сердца и/или КМП 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).



Таблица 30. Клинические характеристики пациентов с синдромом Хантера, геном которых содержит патогенные варианты

Нуклеотидный вариант	Аминокислотный вариант	Возраст начала, мес	Грыжи	Грубые черты лица	Макроглоссия	Множественный дизостоз
<i>c.1466del</i>	<i>p.G489Afs*7</i>	8	+	+	-	+
<i>c.1288G>T</i>	<i>p.E430*</i>	7	-	+	-	+
<i>c.598C>T</i>	<i>p.Q200*</i>	1	+	+	+	-
<i>c.697A>G</i>	<i>p.R233G</i>	9	+	+	-	+
<i>c.697A>G</i>	<i>p.R233G</i>	н/д	+	+	-	+
<i>c.1077del</i>	<i>p.I360Yfs*31</i>	17	+	+	+	+
<i>c.39_55dup</i>	<i>p.S19Wfs*5</i>	1	+	+	+	+
<i>c.512G>A</i>	<i>p.C171Y</i>	59	+	+	-	+
<i>c.800_801del</i>	<i>p.W267Rfs*74</i>	12	+	+	+	+
<i>c.427T>C</i>	<i>p.S143P</i>	1	+	+	+	+
<i>c.998C>A</i>	<i>p.S333*</i>	18	+	+	+	+
<i>c.998C>A</i>	<i>p.S333*</i>	13	-	+	+	+
<i>c.812_830delinsTC</i>	<i>p.R271Ifs*65</i>	7	+	+	+	+
<i>c.305del</i>	<i>p.L102Rfs*28</i>	н/д	+	+	+	+
<i>c.880-2del</i>	-	5	+	+	+	+
<i>c.133G>T</i>	<i>p.D45Y</i>	8	+	+	+	+
<i>c.1028del</i>	<i>G343Efs*17</i>	12	+	+	+	+
<i>c.1006+2T>G</i>	-	39	+	+	+	+
<i>c.1438_1442del</i>	<i>p.P480Ffs*17/IDS del</i>	26	-	+	-	+
<i>c.776_777dup</i>	<i>p.P260Yfs*21</i>	6	+	+	+	+

Примечание. н/д – нет данных.



1.1.4. ЦИСТИНОЗ

Редкое наследственное заболевание, причиной развития которого служат мутации гена *CTNS*, кодирующего лизосомный переносчик цистина, что приводит к накоплению цистина и отложению его кристаллов в лизосомах клеток различных органов и тканей, преимущественно в почках. Средняя частота болезни колеблется в пределах 1 : 115 000 в Дании [300] до 1 случая на 260 000 живых новорожденных в Швеции [461] с повсеместной представленностью болезни во всех этнических группах в соотношении мужчин и женщин 1,4 : 1 [712]. При этом даже в рамках одной страны распространенность болезни может сильно варьировать. Так, во французской провинции Бретань цистиноз встречается с частотой 1 случай на 25 909 человек, тогда как на остальной территории Франции – с частотой 1 случай на 326 440 человек [96, 95]. Самая высокая частота болезни (1 : 3600) описана среди пакистанцев, проживающих в Вестмидланде в Великобритании [483]. А в Египте цистиноз превалирует среди лизосомных болезней накопления, составляя 14% широкого спектра изученных ЛБН [313]. Ежегодно в США регистрируются 15–20 новых случаев цистиноза [710]. Болезнь наследуется по аутосомно-рецессивному типу.

В 1903 году цистиноз впервые описал швейцарский биохимик Эмиль Абдергальден как семейную болезнь накопления цистина, ссылаясь на пациента, обнаруженного Эдуардом Кауфманном и умершего в 21-месячном возрасте от почечной недостаточности [67]. Позднее, в 1924 году, голландский патологоанатом Джордж Линьяк впервые подробно описал сочетание болезни почек, рахита и задержки роста как клинические проявления цистиноза [579]. Именно поэтому долгое время цистиноз называли синдромом Абдергальдена–Кауфманна–Линьяка, однако позднее вернулись к названию цистиноз, первоначально заявленному Абдергальденом в своем труде. В конце 60-х годов прошлого века ученые смогли отнести цистиноз к группе лизосомных болезней накопления, получив доказательства локализации скопления цистина внутри лизосом [847].

Цистин проникает в клетку посредством транспортеров, расположенных на апикальной мембране клетки, а в лизосому – в комплексе с белками, содержащими цистин и расщепляемыми под действием гидролаз, тогда как выводится обратно в цитоплазму посредством цистинозина, где легко восстанавливается до двух молекул цистеина и используется в качестве субстрата для синтеза глутатиона, либо разлагается до неорганического сульфата и выводится из клетки (рис. 27) [1024].



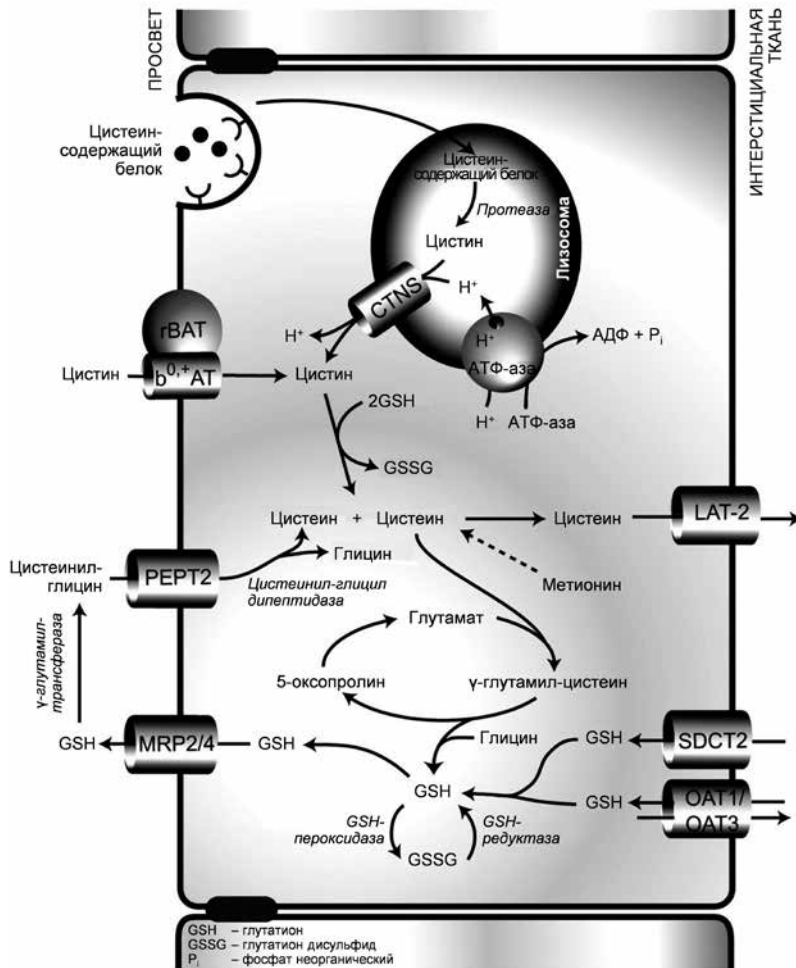


Рис. 27. Метаболизм и транспорт цистина в клетках людей, не пораженных цистинозом. Адаптировано из публикации Wilmer M.J. и соавт., 2010 [1024]

В основе патогенеза цистиноза лежат биаллельные мутации гена *CTNS*, протяженностью 23 т.п.н., расположенного в хромосомной области 17p13.2 и кодирующего цистинозин, состоящий из 367 аминокислотных остатков [948]. Цистинозин экспрессируется на лизосомных мембранах и отвечает за перенос цистина, обусловленный лизосомным протонным градиентом [818]. Неспособность мутированного цистинозина должным образом осуществлять перенос цистина в цитоплазму приводит к постепенному накоплению цистина внутри лизосом с последующей кристаллизацией ввиду низкой растворимости его молекул в воде [1024].

Кристаллы, обладающие свойством двойного преломления в поляризованном свете, обычно имеют форму прямоугольника или шестиугольника, реже бывают игольчатыми. Интересно, что тяжесть повреждения тканей не всегда и не в полной мере коррелирует с объемом их кристаллизации [776]. Например, в печени и тонком кишечнике отмечается значительное интрацеллюлярное отложение кристаллов цистина, но это редко проявляется клинически в связи с более коротким клеточным циклом и быстрой сменой клеточной популяции, либо со значительным функциональным резервом этих органов. А в некоторых клетках, например фибробластах, кристаллы не образуются, несмотря на высокое содержание внутриклеточного цистина [358], при этом гибель клеток происходит за счет активации про-апоптотических сигналов [749].

В зависимости от тяжести клинических проявлений и возраста манифестации заболевания, различают 3 формы цистиноза: классическая инфантильная нефропатическая форма (OMIM 219800), ювенильная (промежуточная) форма (OMIM 219900) и взрослая «доброкачественная» форма (OMIM 219750).

Инфантильная нефропатическая форма наиболее тяжелая и наиболее частая форма цистиноза. На ее долю приходится приблизительно 95% всех случаев болезни [312]. Обычно манифестирует в возрасте 6–12 месяцев с бессимптомной аминоацидурии, характерной для синдрома Фанкони. Потеря способности рецепторов апикальных проксимальных почечных канальцев реабсорбировать натрий, калий, кальций, магний, фосфаты, бикарбонаты, глюкозу, карнитин и другие вещества ввиду накопления кристаллов цистина с последующей сегментарной атрофией канальцев (по типу деформаций лебединой шеи) приводит к гиперкальциурии, фосфатурии, низкомолекулярной и среднемoleкулярной протеинурии, аминоацидурии, нормогликемической глюкозурии и гиперхлоремическому ацидозу [361]. Метаболический ацидоз и электролитные потери приводят к задержке роста [138]. Кальциурия и фосфатурия могут явиться причиной медуллярного нефрокальциноза и нефролитиаза [930]. Потеря карнитина может приводить к мышечной слабости [622]. Фосфатурия и увеличение потерь витамин-D-связывающего белка с мочой, а также снижение почечного синтеза витамина D из-за снижения активности α -1-гидроксилазы в проксимальных почечных канальцах может привести к формированию витамин-D-устойчивого гипофосфатемического рахита у детей [141]. Отложения кристаллов цистина в роговице глаза, как правило, выявляются к двум годам и в отсутствии лечения приводят к фотофобии в раннем детстве. Накопление цистина в фолликулах щитовидной железы вызывает фиброз, атрофию и дисфункцию щитовидной железы у 75% пациентов в возрасте до 10 лет [605]. У мальчиков развивается гипогонадотроп-



ный гипогонадизм; заместительная терапия тестостероном позволяет достигнуть пубертатного развития, но не предотвращает бесплодие [139]. В случае отсутствия лечения, либо его позднего начала, отмечается прогрессирующая потеря гломерулярной функции и развитие хронической почечной недостаточности к 7–12 годам [183, 667]. В связи с тяжелой полиурией эпизоды дегидратации как правило ускоряют терминальную стадию почечной недостаточности в раннем возрасте. Наиболее частыми осложнениями цистиноза у пациентов старше 20 лет являются потеря зрения, дистальная миопатия, церебральная кальцификация, сахарный диабет и поражения печени, включая гепатомегалию и узловую дегенеративную гиперплазию. Несмотря на успешно проведенные трансплантации, многие пациенты умирают в возрасте до 30 лет, если не лечатся цистеамином [316].

Ювенильная форма цистиноза диагностируется в позднем детстве или юности и характеризуется широким спектром клинических проявлений, начиная с бессимптомной изолированной протеинурии и мягкой формы синдрома Фанкони и заканчивая тяжелым нефротическим синдромом. Значительной задержки роста, как правило, не наблюдается. Скорость прогрессирования ХПН невелика. Серваис с коллегами обращают внимание на формирование ХПН у 4 из 14 пациентов с ювенильным цистинозом в возрасте от 12 до 28 лет [862].

Взрослая не нефропатическая форма цистиноза характеризуется самыми мягкими клиническими проявлениями заболевания, связанными с отложениями кристаллов цистина в роговице глаза, в костном мозге и лейкоцитах крови, но не в почках [97].

К методам функциональной диагностики цистиноза относят обнаружение характерных кристаллов цистина в роговице глаза с помощью щелевой лампы [1023]. Однако они, как правило, не выявляются до двухлетнего возраста, что в отсутствие других методов диагностики откладывает раннюю постановку диагноза и начало патогенетической терапии в большинстве неразвитых стран [890]. Другим методом функциональной диагностики цистиноза является метод отражательной конфокальной микроскопии, который позволяет обнаружить кристаллы цистина у пациентов с инфантильной формой цистиноза в раннем возрасте, являясь при этом совершенно безболезненным. В первом подобном исследовании характер отложений дополнительно подтверждался с помощью электронной микроскопии по соответствию обнаруженных частиц кристаллам цистина в фибробластах ретикулярной дермы [227].

Золотым стандартом лабораторной диагностики в настоящее время считается высокоэффективная жидкостная хроматография в комплексе с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС), которая приобрела широкое использование и для мониторинга лечения этого состояния благодаря

прекрасным характеристикам чувствительности, позволяя обнаружить минимальные концентрации цистина, вплоть до 0,02 мкмоль/л [215]. Однако такая диагностика не позволяет проводить массовый неонатальный скрининг на рассматриваемое состояние из-за большого объема крови (~5 мл), требуемого для проведения исследования, а также отсутствия технологии достоверного количественного определения цистина в сухих пятнах крови. Разработке и валидации этой технологии мешает самопроизвольное окисление цистина до цистеина при хранении пятен, а также требования к гораздо более высокой чувствительности используемого оборудования [140].

Молекулярно-генетическая диагностика цистиноза сводится к поиску мутаций в гене *CTNS*, которых к настоящему времени в базе HGMD описано более 120 [464]. Наиболее частой мутацией, выявляемой у больных цистинозом приблизительно в 75% всех описанных в северной Европе случаев, является протяженная делеция, длиной 57 257 п.н., захватывающая 10 первых экзонов гена *CTNS* из 12 существующих, ген *CARKL* и первые 2 экзона гена *TRPV1* [504, 947]. Пациенты, в геноме которых присутствует эта делеция, развивают сильно выраженный экстраренальный фенотип цистиноза и демонстрируют раннюю смертность [360]. Помимо этой делеции, были описаны миссенс- и нонсенс-мутации, мутации сайтов сплайсинга, делеции, инсерции, а также патогенные варианты гена *CTNS*, расположенные в промоторной области и глубоко в интронных областях [919]. Для выявления патогенных вариантов гена *CTNS* используют секвенирование по Сэнгеру, MLPA, аллель-специфическую ПЦР, FISH-диагностику и другие методы исследования [132, 426, 516]. При этом некоторые мутации позволяют экспрессироваться укороченному белку, а некоторые не позволяют экспрессироваться белку вовсе [711].

Для дородовой лабораторной диагностики цистиноза используются методы тандемной масс-спектрометрии и методы молекулярно-генетической диагностики, причем обе технологии диагностики проводятся как в ворсинах хориона, так и в клетках амниотической жидкости [492].

После расшифровки механизма развития цистиноза начались разработки препарата для лечения болезни, направленные на уменьшение содержания цистина в клетке. Умеренные успехи были достигнуты при использовании 1,4-дигидротрейтола (ДТТ) и аскорбиновой кислоты [393, 548], но настоящий экспериментальный прорыв в связывании и удалении цистина из лизосом удалось совершить благодаря использованию аминотиолацистеамина, который до сих пор остается основным лекарственным средством для лечения цистиноза [936]. Цистеамин, с торговым наименованием цистагон (Cystagon®, Mylan Pharma, Morgantown, WV, USA and Orphan Europe, Paris, France), вступая в реак-



цию дисульфидного обмена с цистином, приводит к эквимольной генерации молекул цистеина-цистеамина и цистеина [357], которые транспортируются из лизосом с помощью собственных транспортеров, минуя путь дефектного цистинозина (рис. 28) [761].

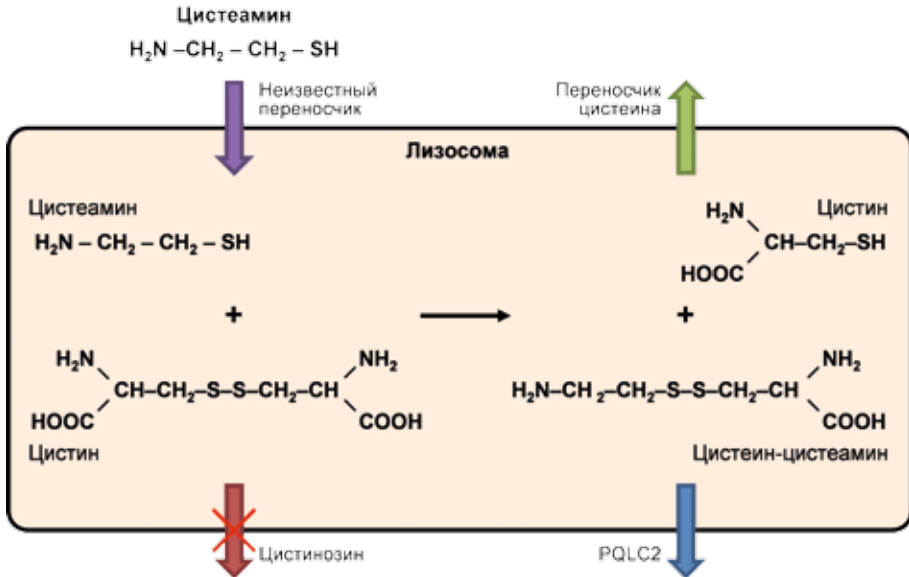


Рис. 28. Преобразование цистина под действием цистеамина и вывод продуктов реакции из лизосом

Препарат был одобрен для клинического использования при терапии цистиноза в 1994 году в США, а в 1997 году в Европе [312]. Эффективность действия цистеамина в клинической практике вычисляют путем измерения уровней внутриклеточного цистина в полиморфноядерных лейкоцитах методом ВЭЖХ-МС/МС. Значимыми для развития болезни принято считать уровни цистина, превышающие уровни цистина, наблюдаемые у гетерозиготных носителей мутаций гена *CTNS*. Эти же измерения позволяют скорректировать оптимальную дозу цистагона, как правило, составляющую от 60 до 90 мг/кг веса пациента, разделенную на 4 приема препарата в сутки перорально [536]. Такая частота приема препарата связана с возвратом к первоначальным уровням цистина в лейкоцитах периферической крови через 6 ч после введения цистагона. Цистеамин освобождает клетки от кристаллов цистина более чем на 90%. Терапия рекомендована всем пациентам с установленным диагнозом независимо от возраста и статуса трансплантации. Несмотря на неспособность остановить развитие синдрома Фанкони, цистагон замедляет повреждение клубочков

и задерживает, а в некоторых случаях предотвращает развитие ХПН [629]. Кроме того, доказано, что цистагон, принимаемый перорально, не оказывает существенного влияния на развитие мужского бесплодия и кристаллизацию молекулами цистина роговицы глаза [356]. Глазные капли с торговым наименованием Цистодропс (Cystadrops®, Orphan Europe, Paris, France), содержащие цистеамин, вводили более 10 раз в сутки с целью растворения кристаллов цистина, отложенных в роговице глаза и ослабления светобоязни, начиная, как правило, с начального школьного возраста [359]. Позднее оптимальная доза введения препарата была скорректирована до 4 приемов в сутки по одной капле в каждый глаз [555].

Почечная трансплантация обычно рекомендуется, когда клиренс креатинина падает ниже 20 мл/мин/1,73 кв. м, а азотемия и гипертензия быстро прогрессируют [710]. Почечный аллотрансплантат избавляет от синдрома Фанкони, но не лечит другие мультисистемные осложнения. Хотя кристаллы цистина наблюдаются в почечном трансплантате, они не имеют ни патологического, ни клинического значения, так как возникают из-за моноклеарных клеток хозяина [897]. Симптоматическое поддерживающее лечение цистиноза должно быть направлено на поддержание адекватного уровня электролитов и обеспечение кислотно-щелочного баланса, а также на обеспечение адекватной замены необходимых гормонов и предотвращение развития рахита.

Разработка генетических методов диагностики направлена на определение мутаций, характерных для популяций, населяющих территорию России, с целью дальнейшей оптимизации подтверждающей диагностики.

1.1.4.1. Селективный скрининг цистиноза у российских пациентов

Разработанный и валидированный метод хромато-масс-спектрометрического измерения цистина в лейкоцитах крови посредством тандемной масс-спектрометрии позволил выявить концентрации цистина, превышающие отрезную точку у 25 детей из 67 (37,3%) пациентов, доставленных в нашу лабораторию с подозрением на цистиноз. Значения концентрации цистина у выявленных детей находились в диапазоне от 2,6 до 8,9 нмоль $\frac{1}{2}$ цистина/мг белка при нормальных значениях цистина у здоровых людей до 0,45 нмоль $\frac{1}{2}$ цистина/мг белка, что очень близко к значениям, полученным при проведении соответствующих зарубежных исследований [1023].

Значение этой отрезной точки было выбрано на основе значения отрезной точки в работах зарубежных авторов [378], а также с уче-

том полученных нами референсных значений концентрации цистина и значений концентрации цистина у пациентов с цистинозом. После проведения скрининга значение отрезной точки для определения концентрации цистина было оставлено на прежнем уровне 1,0 нмоль $\frac{1}{2}$ цистина/мг белка. Это значение соответствовало максимальным показателям чувствительности (100%) и специфичности (100%) для методики определения концентрации цистина в полиморфонуклеарных лейкоцитах. Интервал значений концентрации цистина у всех выявленных в результате скрининга пациентов с цистинозом лежал выше и не перекрывался со значением концентрации этого анализа в группе контроля.

Секвенирование кодирующих и прилегающих интронных областей гена *CTNS* у пациентов, выявленных в результате скрининга, и восьми пациентов с диагнозом, установленным ранее, позволило подтвердить диагноз 33 детям, 20 (60,6%) мальчикам и 13 (39,4%) девочкам, и выявить 16 различных вариантов гена. При этом девять вариантов гена (56,3%) были описаны ранее как патогенные, тогда как семь других вариантов (43,8%) не были описаны ранее в международной базе данных HGMD.

1.1.4.2. Клинические, географические и генетические особенности цистиноза

Для оценки возрастных характеристик обследованных нами российских детей с цистинозом суммарно удалось проанализировать данные 25 (75,7%) детей в среднем возрасте 6 лет и 5 месяцев (стандартное отклонение 4 года и 1 месяц), медиана 6 лет и 3 месяца (от 5 месяцев до 12 лет) на момент проведения исследования. Диагноз был заподозрен на основе определенных клинических признаков, манифестировавших в среднем в возрасте 1 года и 5 месяцев, медиана 7 месяцев.

Географические особенности распространения цистиноза на территории РФ удалось установить для 31 (93,9%) пациента из 30 семей,отягощенных заболеванием (табл. 31).

Выявленные случаи цистиноза распределились по 19 (22,3%) субъектам РФ с преобладанием в Чеченской Республике (4/12,9%), Карачаево-Черкесской Республике (3/9,7%) и Московской области (3/9,7%). В Мордовии, Татарстане, Башкортостане, Кабардино-Балкарии и Новосибирской области цистиноз был обнаружен в двух семьях (6,5%). На эти восемь субъектов приходится 64,5% описываемых случаев цистиноза, для которых известны географические данные. В остальных 11 субъектах РФ проживает по одной семье, отягощенной цистинозом. Уникальным для исследованных в этой научной работе болезней выглядит отсутствие пациентов с цистинозом из Москвы.

Таблица 31. Распределение обследованных нами пациентов с цистинозом в различных субъектах РФ

Субъект	Численность населения	Число семей	Число случаев	Частота в субъекте*
Чеченская Республика	1 456 951	3	4	1:364 238
Карачаево-Черкесская Республика	465 563	3	3	1:155 188
Московская область	7 599 756	3	3	1:2 533 252
Республика Мордовия	795 502	2	2	1:397 751
Республика Татарстан	3 898 700	2	2	1:1 949 350
Республика Башкортостан	4 051 005	2	2	1:2 025 503
Кабардино-Балкарская Республика	866 310	2	2	1:433 155
Новосибирская область	2 793 389	2	2	1:1 396 695
Хабаровский край	1 328 332	1	1	1:1 328 332
Санкт-Петербург	5 383 968	1	1	1:5 383 968
Алтайский край	2 332 511	1	1	1:2 332 511
Республика Крым и Севастополь	2 355 027	1	1	1:2 355 027
Краснодарский край	5 648 254	1	1	1:5 648 254
Ставропольский край	2 795 103	1	1	1:2 795 103
Оренбургская область	1 963 007	1	1	1:963 007
Костромская область	637 296	1	1	1:637 296
Республика Коми	830 235	1	1	1:830 235
Республика Ингушетия	497 393	1	1	1:497 393
Республика Дагестан	3 085 738	1	1	1:3 085 738

Примечание. *На основе выборки пациентов, обследованных в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

Анализ данных, проведенный на уровне федеральных округов, позволяет установить преобладание случаев цистиноза (12/38,7%) в Северо-Кавказском федеральном округе. В Приволжском федеральном округе проживает 7 (22,6%) пациентов с цистинозом, а в Центральном и Сибирском федеральных округах проживают по 4 (12,9%) ребенка, в Южном – 2 (6,5%), в Северо-Западном и Дальневосточном федеральных округах проживают по одному (3,2%) пациенту (табл. 32).

Таблица 32. Распределение обследованных нами детей с цистинозом в различных федеральных округах

Федеральный округ	Численность населения	Число семей	Число пациентов	Частота в округе*
Северо-Кавказский	9 866 370	11	12	1:822 198
Приволжский	29 397 227	7	7	1:4 199 604
Сибирский	17 173 185	4	4	1:4 293 296
Центральный	39 378 947	4	4	1:9 844 737
Южный	16 454 580	2	2	1:8 227 290
Северо-Западный	13 972 061	1	1	1:13 972 061
Дальневосточный	8 188 594	1	1	1:8 188 594

Примечание. *На основе выборки пациентов, обследованных в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

Частоты встречаемости различных клинических проявлений цистиноза на момент госпитализации после постановки лабораторного диагноза и до проведения СРТ удалось оценить у 27 (81,8%) обследованных пациентов по девяти различным параметрам (рис. 29).

У всех обследованных детей, клинические проявления которых удалось описать, был выявлен вторичный синдром Фанкони. У 94% обследованных детей обнаружена кератопатия, у 88% – задержка физического развития, у 81% – мышечная слабость, у 75% – полидипсия/полиурия и хроническая болезнь почек. Задержка психоречевого развития и рвота наблюдались у половины обследованных детей, а рахитоподобные изменения скелета – у 45%. Фенотип обследованных нами пациентов по большей части совпадал с зарубежными исследованиями [711].

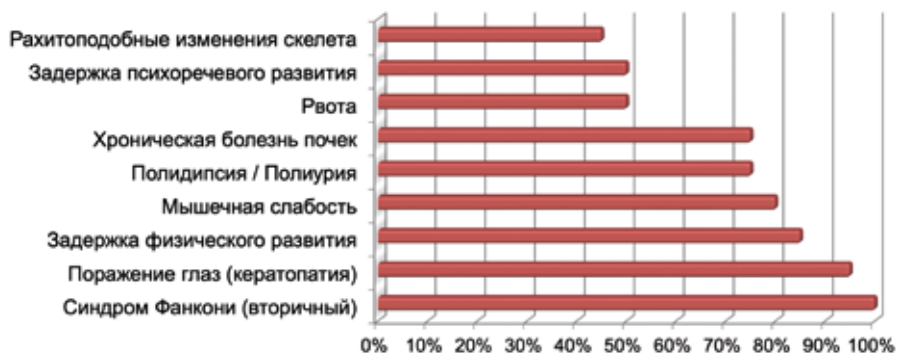


Рис. 29. Частоты девяти различных клинических проявлений цистиноза среди обследованных пациентов

На рис. 30 показаны относительные частоты и спектр мутаций гена *CTNS* у российских детей с цистинозом. Среди описанных ранее вариантов гена *CTNS* преимущественно выявлялась протяженная делеция 57257 п.н., имеющая 50–60%-ное распространение среди жителей Европы и Северной Америки [95, 96, 426, 516, 535], обнаруженная на 20 аллелях (30,3%) у 14 (42,4%) российских детей с инфантильным цистинозом. Различия в частотах этой делеции среди европейских и российских пациентов могут объясняться как недообследованностью российских детей ввиду летальных исходов в раннем возрасте, так и межпопуляционными различиями.

Миссенс-мутация *c.518A>G*, приводящая к замене аминокислотных остатков *p.Y173C*, описанная ранее у ребенка с инфантильной формой цистиноза, диагностированного в возрасте 12 месяцев [945], выявлена на 11 (16,9%) аллелях у 6 (18,2%) детей из пяти неродственных семей. Дети, болеющие цистинозом из четырех семей, проживающие в Чеченской Республике и Московской области, принадлежат чеченскому этносу, тогда как ребенок из одной семьи проживает в Ингушетии. Обнаруженная мутация может указывать как на эффект основателя, так и на то, что она может быть характерна для чеченского этноса, что позволяет начинать молекулярно-генетическую диагностику цистиноза для представителей чеченского этноса с выявления именно этого патогенного варианта.

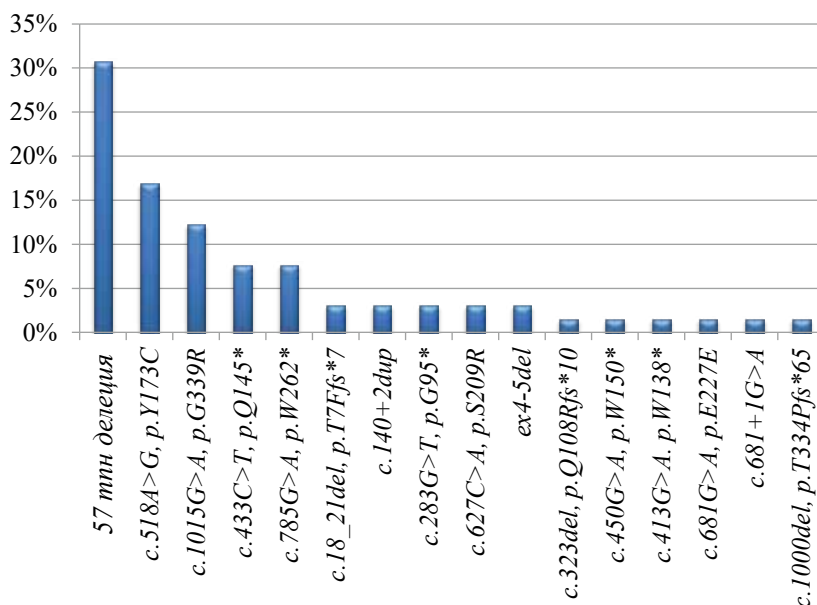


Рис. 30. Относительные частоты и спектр мутаций гена *CTNS* у российских детей с цистинозом



Мутация *c.1015G>A*, приводящая к замене аминокислотных остатков *p.G339R*, описанная ранее среди американцев, турков и иранцев с инфантильной формой цистиноза [379, 945, 1063], встретилась на восьми аллелях (12,3%) у 5 (15,2%) пациентов из трех семей, проживающих в Карачаево-Черкесской Республике, одной семье из Кабардино-Балкарской Республики и одной семье из Ставропольского края. Вероятно, эта мутация может быть характерна для карачаевской этнической группы, ввиду того что четверо пациентов являются карачаевцами, а этническую принадлежность пятого установить не удалось, что позволяет рекомендовать проведение молекулярно-генетической диагностики цистиноза для представителей карачаевской народности с выявления этого патогенного варианта гена *CTNS*. Нуклеотидные замены *c.433C>T* и *c.785G>A*, приводящие к преждевременной терминации трансляции *p.Q145** и *p.W262**, не были описаны ранее. Каждая из них была найдена на пяти (7,7%) аллелях у четырех (12,1%) пациентов. Патогенный вариант *c.785G>A* встретился в трех семьях из Татарстана и Башкирии и в одной семье из Московской области, тогда как *c.433C>T* был обнаружен у детей из различных регионов РФ. Именно эти пять мутаций можно считать мажорными мутациями для всех обследованных российских детей, остальные мутации встретились с долями менее 10% (см. рис. 30).

Среди 16 вариантов гена *CTNS* преобладали пять (31,3%) различных нонсенс-мутаций, пять (31,3%) делеций, включая две протяженные, три (18,8%) миссенс-мутации и три (18,8%) мутации, приводящие к сплайсингу. При этом нуклеотидные варианты, расположенные в канонических сайтах сплайсинга и представленные дубликацией одного нуклеотида, синонимичной заменой, а также интронной заменой, встретились у единичных пациентов в гомозиготном и дважды гетерозиготном состоянии соответственно (рис. 31).

Особого внимания заслуживает тот факт, что гомозиготные мутации гена *CTNS* встречаются в 19 случаях из 33 обследованных детей, составляя 57,6% выявленных случаев цистиноза. Такая закономерность характерна для изолированных популяций с высоким процентом близкородственных браков и требует обязательного медико-генетического консультирования при планировании беременности.

У одного пациента с высоким значением концентрации цистина при секвенировании по Сэнгеру не удалось выявить продукт амплификации экзонов 4–5 гена *CTNS*, на основании чего было заподозрено наличие биаллельной делеции этих экзонов. Для проверки этого предположения был проведен анализ этой области гена методом MLPA, что подтвердило делецию экзонов 4–5 гена *CTNS*, описанную ранее [95].

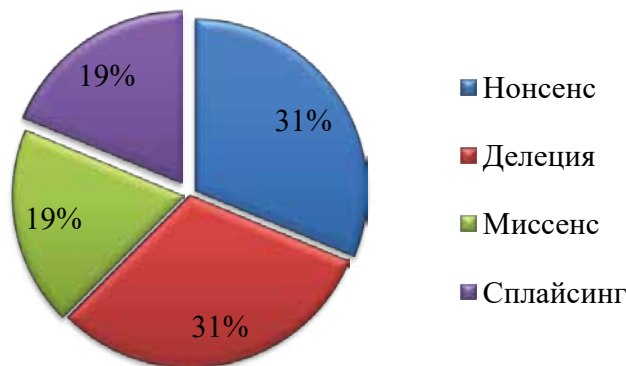


Рис. 31. Доли различных типов мутаций у российских детей с цистинозом

1.1.4.3. Описание новых патогенных и вероятно патогенных вариантов гена *CTNS*

Из семи вариантов, не описанных ранее в базе данных HGMD (рис. 32), наибольшей частотой 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.

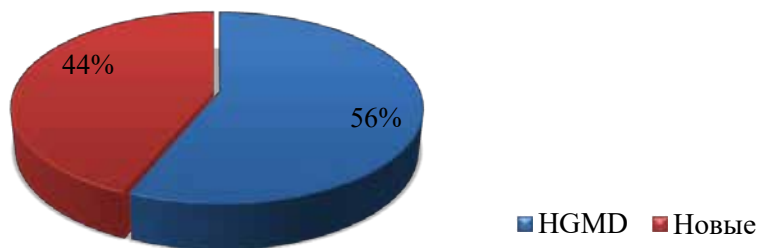


Рис. 32. Соотношение вариантов гена *CTNS*, описанных и не описанных ранее в международной базе данных HGMD

1.1.4.4. Генотип-фенотипические корреляции

Высокий процент гомозиготных мутаций гена *CTNS* среди обследованных нами пациентов позволил описать корреляции этих мутаций с концентрацией цистина в крови пациентов до проведения СРТ. Вариант *c.627C>A* гена *CTNS*, приводящий к замене аминокислотных остатков *p.S209R*, выявленный нами в гомозиготном состоянии и не описанный ранее, соответствовал наименьшему значению цистина, тогда как вариант *c.283G>T*, приводящий к преждевременной терминации трансляции *p.G95**, соответствовал наибольшему значению цистина, измеренному нами у пациентов до получения СРТ (рис. 33).

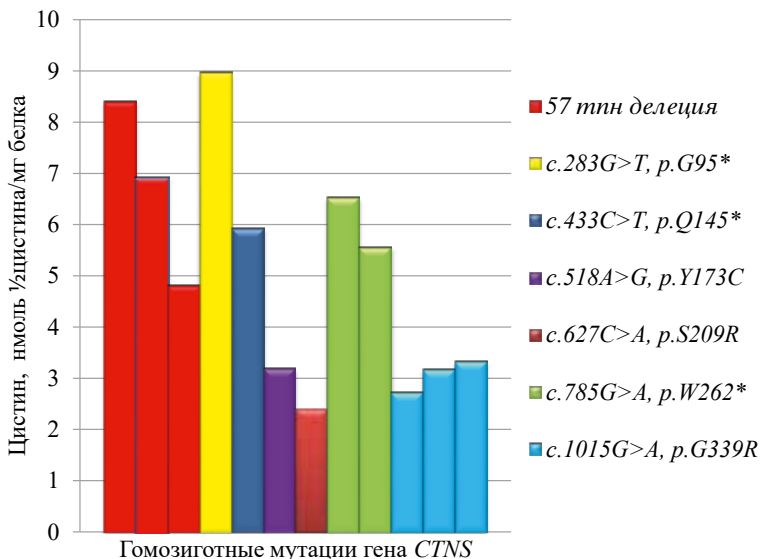


Рис. 33. Взаимосвязь показателей концентрации цистина, измеренной до получения СРТ, и мутаций гена *CTNS*

Примечание. Столбцы соответствуют значениям концентрации цистина у пациентов с обнаруженными гомозиготными мутациями гена *CTNS*. Каждый из семи различных патогенных вариантов гена *CTNS* обозначен своим цветом.

На основании проведенного анализа полученных данных были обнаружены статистически достоверные различия ($p=0,003$) 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 столь значимым превышением нормальных концентраций цистина в периферической крови в группе пациентов с гомозиготными миссенс-мутациями *c.518A>G*, *c.627C>A*, *c.1015G>A* гена *CTNS* (табл. 33) [58]. Иными словами, у пациентов, обладающих гомозиготными стоп-кодонами, уровни цистина значительно выше по сравнению с пациентами, обладающими миссенс-мутациями.

Таблица 33. Расчет корреляции уровня цистина с определенными типами мутаций гена *CTNS* у российских детей с цистинозом

Параметр	Пациенты с гомозиготными миссенс-мутациями	Пациенты с гомозиготными стоп-кодонами	р-значение (критерий Манна-Уитни)
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%).

По аналогии с большинством изученных нами болезней, было ожидаемо, что мутации, приводящие к укороченному белку, будут коррелировать с ранней манифестацией и тяжелым клиническим течением цистиноза, однако отсутствие необходимой для расчетов клинической информации не позволило получить необходимый уровень достоверности. При этом работы зарубежных ученых, описывающие различные популяционные группы, демонстрируют ассоциацию мутаций, преждевременно прерывающих синтез белка, с ранней манифестацией и тяжелой клинической картиной цистиноза [80, 84, 332, 919]. На основании совокупности этих данных можно предположить, что высокие показатели цистина могут напрямую коррелировать с тяжелым течением цистиноза, а значит, могут служить неблагоприятным прогностическим фактором для пациентов с «количественными» мутациями гена *CTNS*.

1.1.4.5. Мониторинг терапии цистиноза

Повторное измерение концентрации цистина проводилось во время патогенетического лечения пациентов препаратом цистагон. В большинстве случаев показатели цистина были в пределах нормальных значений. Однако у двух детей было обнаружено превышение нормы, что в одном случае было обусловлено перерывом в приеме препарата, а в другом – необходимостью коррекции выбранной дозы (табл. 34).

Таблица 34. Расчет достоверности различий в значениях концентрации цистина до проведения СРТ и через 6 месяцев после первого приема цистагона

Показатель	До лечения	Во время лечения	p-значение (критерий Уилкоксона)
Концентрация цистина, ½ цистина/мг белка	4,6 (3,2–5,8)	0,78 (0,2–1,1)	<0,001

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

Повторные измерения цистина у этих пациентов во время следующей госпитализации в наш Центр позволили констатировать нормальные значения. Измерение концентрации цистина в крови пациентов, получающих СРТ, продемонстрировало способность контролировать и в случае необходимости корректировать лечение, предупреждая нежелательные последствия прекращения приема препарата по тем или иным причинам, и, как следствие, подтвердило особую эффективность лечения в случае раннего начала приема препарата цистагон, описанную также в работах иностранных коллег [301, 312, 398]. Так, пациенты, начавшие получать СРТ в возрасте до 25 месяцев, достигают тХПН в среднем возрасте 11 лет, тогда как пациенты, находящиеся на терапии с возраста старше 30 месяцев, достигают тХПН в среднем к 8 годам. При этом необходимо учитывать, что пациенты, обладающие «мягкими» мутациями, по всей видимости, имеют более благоприятный прогноз. К примеру, пациент, обладающий мутацией *c.627C>A* в гомозиготном состоянии, достиг 5 стадии ХБП в возрасте 8 лет 9 месяцев, тогда как другой пациент с миссенс-мутацией *c.1015G>A* и мутацией, нарушающей сайт сплайсинга *c.681G>A*, *p.E227E*, находится на диализе с 7 лет 8 месяцев. При этом оба пациента не получают цистагон.

1.1.4.6. Оптимизация алгоритма генетической диагностики цистиноза

Более 90% обнаруженных нами случаев цистиноза приходится на протяженную делецию, длиной 57 т.п.н., а также на мутации, расположенные в области экзонов 7–10 и 12а гена *CTNS*, которые находятся в непосредственной близости друг от друга, что позволяет рекомендовать начинать молекулярно-генетическую диагностику цистиноза с исследования этих областей гена. При этом наибольшее разнообразие мутаций гена *CTNS* приходится на область экзона 9, тогда как в экзонах 5, 11 и 12с проведенное нами исследование не выявило ни одной мутации (рис. 34).

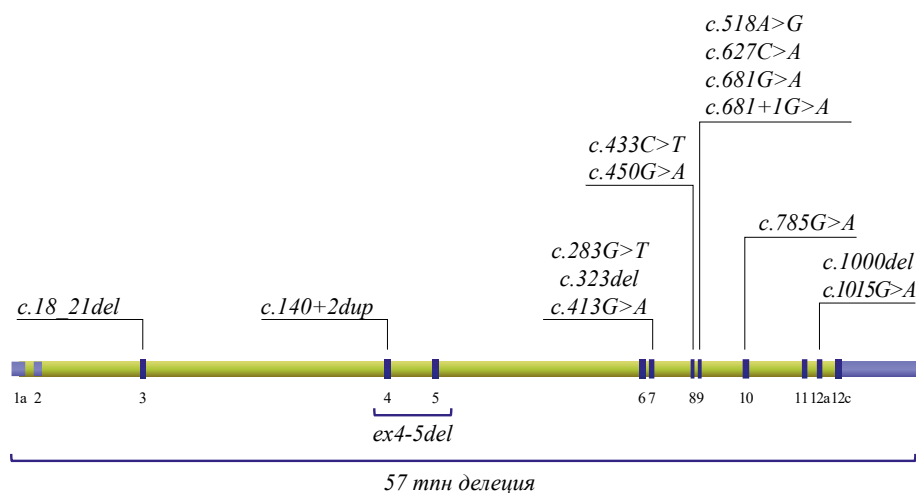


Рис. 34. Распределение выявленных мутаций на карте гена *CTNS* (NM_001031681.2)

На данный момент не существует единственного стопроцентно чувствительного и специфичного метода лабораторной диагностики цистиноза, так как измерение концентрации цистина может давать ложноотрицательные результаты у новорожденных детей [332], однако в нашем исследовании этого продемонстрировано не было. При этом секвенирование по методу Сэнгера может выявлять не все патогенные варианты, поэтому в случае поступления в лабораторию образца крови с подозрением на цистиноз, предлагается следующий алгоритм генетической диагностики:

1) измерение концентрации цистина в полиморфнонуклеарных 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 МЛРА.

1.1.4.7. Выводы

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 [332] не позволяют включить цистиноз в соответствующие программы скрининга. К сожалению, педиатры не всегда способны адекватно трактовать наличие полиурии, глюкозурии, аминокацидурии, гипокалиемии, гипофосфатемии, сопутствующие задержке развития и почечному рахиту, как признаки синдрома ДеТони–Дебре–Фанкони, основной этиологией которого является цистиноз. Редко и в большинстве случаев поздно в исследование включается офтальмоскопия, позволяющая установить признаки отложения кристаллов цистина в роговице глаза. Только скрупулезная оценка данных клинических признаков вкупе с клинической настороженностью в отношении цистиноза позволяет выделить группу пациентов, которым показано выполнение исследований, описанных в данной работе. 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. Разработанные методы генетической диагностики цистиноза, включающие измерение концентрации цистина и последующее генетическое исследование [835], 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%. Были выявлены мутации, характерные для определенных этносов, населяющих территорию РФ, что позволило предложить

оптимизацию алгоритма диагностики цистиноза. В частности, мутация *c.1015G>A* гена *CTNS*, вызывающая нефропатический цистиноз, характерна для карачаевской этнической группы, а *c.518A>G* того же гена – для чеченской. Кроме того, удалось выявить статистически достоверные различия ($p=0,003$) 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*, что может служить неблагоприятным прогностическим фактором для пациентов с «количественными» мутациями гена. Именно ранняя диагностика, а также раннее начало комплексной терапии, совмещающей в себе симптоматическую и патогенетическую субстрат-редуцирующую терапию, и продолжение последней в течение всей жизни пациента имеют первостепенное значение для обеспечения лучшего контроля над нефропатическим цистинозом, мониторируемым посредством измерения концентрации цистина, предотвращая существенное замедление роста и задерживая наступление тХПН и других почечных и внепочечных осложнений.

1.2. НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ НАРУШЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ. ТИРОЗИНЕМИЯ, ТИП I

Редкое наследственное заболевание, причиной развития которого служат патогенные изменения нуклеотидной последовательности гена *FAH*, приводящие к сниженной активности кодируемой фумарилацетоацетат гидролазы и, как следствие, к накоплению фумарилацетоацетата, малеилацетоацетата и сукцинилацетона, оказывающих токсическое действие на ткани всего организма, в первую очередь на клетки печени и почек. Тирозинемия, тип I встречается в среднем в 1 случае из 100 000–120 000 живых новорожденных [676]. В европейском регионе наибольшая встречаемость зарегистрирована в Норвегии и Финляндии, где тирозинемией, тип I болеет 1 новорожденный из 74 000 и 1 новорожденный из 60 000 младенцев, рожденных живыми, соответственно [158]. В американском регионе наибольшей распространенностью тирозинемии, тип I обладает канадская провинция Квебек, где болезнь встречается в одном случае из 16 000 живых новорожденных [404]. При этом ученые считают, что прижизненно диагностируется менее 50%



случаев заболевания. Тирозинемия, тип I наследуется по аутосомно-рецессивному типу, сопровождаясь 25%-ным риском рождения больных детей у родителей, являющихся носителями болезни.

В 1956 году Маргарет Д. Бабер впервые описала тирозинемия [109]. В 1965 году шведский врач Рольф Зеттерстрем и его коллеги опубликовали подробное описание заболевания и его разновидности, а в 1977 году Бенгт Линдبلاد с соавторами описали дефектный фермент, лежащий в основе описываемого состояния [586].

Единственной причиной тирозинемии, тип I являются мутации гена *FAH*, длиной 34457 п.н., расположенного на длинном плече хромосомы 15 в области 15q25.1 и кодирующего белок, состоящий из 419 аминокислотных остатков с молекулярной массой 46374 Да [374]. Фумарилацетоацетат гидролаза, являющаяся продуктом синтеза этого гена, катализирует последнюю стадию процесса метаболизма тирозина, гидролизует фумарилацетоацетат до фумаровой кислоты и ацетоуксусной кислоты. Дефекты гена *FAH* снижают активность гидролазы, приводя к накоплению чрезвычайно токсичных фумарилацетоацетата и его предшественника малеилацетоацетата, которые, в свою очередь превращаются в сукцинилацетоацетат и далее в сукцинилацетон, вызывая клинические проявления тирозинемии, тип I [529]. Частично нерасщепленный фумарилацетоацетат накапливается в гепатоцитах и клетках почечных канальцев, вызывая их повреждение и дальнейший апоптоз [317]. Тогда как сукцинилацетон, накапливаемый в организме в результате декарбоксилирования сукцинилацетоацетата, ингибирует активность порфириногенсинтазы, что приводит к снижению биосинтеза гема и увеличению содержания дельта аминولهвулиновой кислоты, сопровождаясь неврологическими эпизодами с симптомами острой перемежающейся порфирии, с одной стороны, и незначительно ингибирует активность диоксигеназы парагидроксифенилпируватной кислоты, приводя к увеличению уровня тирозина в крови, с другой стороны (рис. 35) [521]. В клетках почечных канальцев сукцинилацетон выступает в роли митохондриального токсина, ингибируя уровень фосфорилирования посредством цикла Кребса и нарушая трансмембранный транспорт [616].

Несмотря на известные к настоящему времени биохимические пути, полиорганный дисфункция при тирозинемии, тип I, обнаруженная на клеточном уровне, до конца не раскрыта. Одни исследования показали, что фумарилацетоацетат способен индуцировать митотические аномалии и нестабильности генома [501], что в совокупности с его способностью приводить клетки печени и почек к апоптозу является одной из гипотез возникновения гепатоцеллюлярной карциномы у пациентов с наследственной тирозинемией. В других исследованиях было пока-

зано, что фумарилацетоацетат ингибирует действие ДНК-гликозилаз, участвующих в процессах узнавания и удаления мутантных азотистых оснований из нуклеотидной последовательности генома [157]. Такие исследования заметно проясняют этиологические события, происходящие между промежуточными метаболитами и мутационными процессами, приводящие к необратимым полиорганным изменениям, возникающим при тирозинемии, тип I.

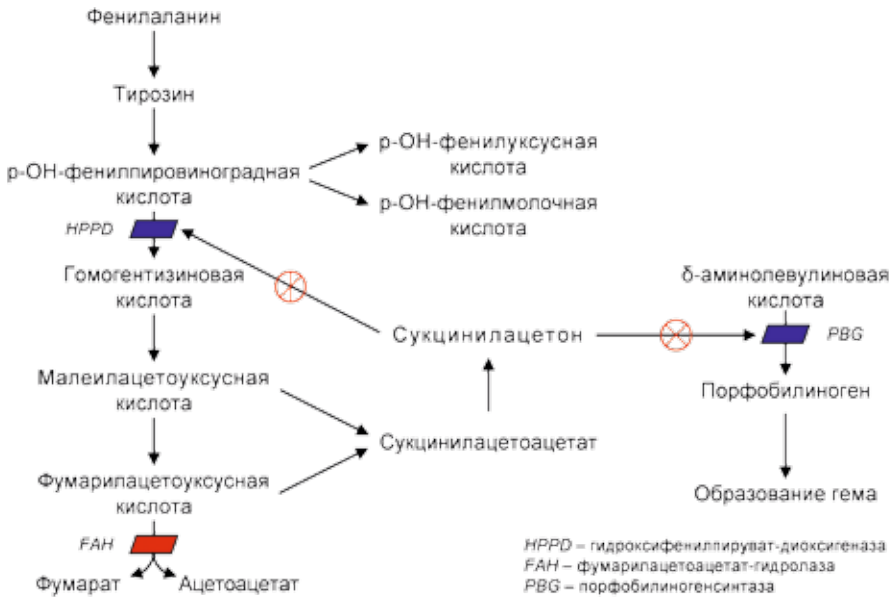


Рис. 35. Метаболические пути фенилаланина и тирозина. Адаптировано из публикации King S.L. и соавт., 2017 [521]

Интоксикация продуктами аномального распада тирозина и их конечными метаболитами приводит к прогрессирующему заболеванию печени с развитием печеночной недостаточности, цирроза печени, тубулопатии с формированием ренальной тубулопатии, гипофосфатемическим рахитом и синдромом Фанкони. Разделяют две формы тирозинемии, тип I в зависимости от возраста дебюта и тяжести клинической симптоматики. Острая форма тирозинемии, тип I характеризуется ранним дебютом в первые недели или месяцы жизни и сопровождается задержкой развития, гепатомегалией, гипертрофической кардиомиопатией, фульминантной печеночной недостаточностью с тяжелой коагулопатией, рвотой, диареей, фебрильной лихорадкой, гипергидрозом, у некоторых детей ощущается капустный запах тела. Младенцы иногда имеют постоянную гипогликемию; некоторые из них гиперинсули-

низм [124]. Непосредственной причиной смерти у детей до 2 месяцев нередко становится внутрочерепное кровоизлияние, позднее – острая печеночная недостаточность. Как правило, в отсутствие лечения смерть наступает до года. Острая форма зачастую остается нераспознанной либо подтверждается после смерти ребенка [47]. У детей с подострым и хроническим течением тирозинемии, тип I заболевание проявляется на 1–2-м году жизни в виде гепатомегалии, гипогликемии, потливости, слабости, полиурии, витамин D-резистентного рахита, позднее формируется гепатоцеллюлярная карцинома, тубулопатия, артериальная гипертензия и периферическая полинейропатия. Заболевание может начаться с симптоматики острой перемежающейся порфирии. Отмечается задержка роста, на 3–4 года отстает физиологическая смена зубов, задерживается костный возраст. Хроническая форма тирозинемии, тип I обычно сопровождается тирозинемическими кризами, провоцируемыми белковой пищей. В отсутствие лечения смерть, как правило, наступает в возрасте до 10 лет от печеночной недостаточности, гепатоцеллюлярной карциномы либо неврологического криза [47].

На биохимическом уровне тирозинемия, тип I проявляется в значительном увеличении уровня альфа-фетопротейна, даже в пуповинной крови новорожденных. Позднее диагностируются повышенные уровни тирозина и метионина, что уже может свидетельствовать о серьезном повреждении печени и соответствующей печеночной декомпенсации. При этом повышенные уровни тирозина в плазме крови нельзя считать специфическим показателем повреждения печени, так как они наблюдаются у здоровых детей раннего возраста, питающихся по формуле с высоким содержанием белка [925], в том числе неразбавленным козьим молоком [429], и специфическим показателем тирозинемии, тип I у младенцев, так как они скорее наблюдаются у младенцев, болеющих тирозинемией, тип II и III. По мере прогрессирования заболевания повышаются уровни других аминокислот в плазме крови. В моче выявляется протеинурия, фосфатурия, глюкозурия и аминокислотурия, растут концентрации гидроксифенилпирувата, гидроксифенилацетата и гидроксифениллактата. Кроме того, наблюдается дефицит дегидратазы дельта-аминолевулиновой кислоты, которая используется в канадской провинции Квебек как биомаркер тирозинемии, тип I при проведении неонатального скрининга [383]. Чаще всего в качестве патогномичного биомаркера тирозинемии, тип I используется сукцинилацетон, концентрация которого измеряется в моче и крови методом газовой хроматографии и тандемной масс-спектрометрии соответственно. Именно такие исследования проводятся в настоящее время для выявления случаев тирозинемии в рамках массового неонатального скрининга в большинстве развитых стран [83, 791].

Однако, описаны случаи тирозинемии, тип I, при которых уровни сукцинилацетона находятся в пределах референсных значений [156, 211, 803], что может указывать на значительное число случаев тирозинемии, тип I, остающихся недиагностированными посредством проводимого скрининга [94]. Поэтому молекулярно-генетическое исследование гена *FAH*, проводимое с целью поиска гомозиготных, либо компаунд-гетерозиготных мутаций в кодирующих и прилегающих интронных областях гена, рекомендуется проводить всем детям с клиническими проявлениями, указывающими на тирозинемии, тип I, включая криптогенный цирроз [156].

Для тех популяционных групп, в которых отчетливо прослеживается эффект основателя, молекулярно-генетическую диагностику начинают с поиска частых мутаций методом ПЦР-ПДРФ, либо ПЦР в режиме реального времени. Так, миссенс-мутация *p.Pro261Leu* встречается в >99% случаев среди евреев ашкенази, больных тирозинемией, тип I [314], а сплайсинговая мутация *c.1062+5G>A* превалирует среди канадцев французского происхождения из провинции Квебек, встречаясь в 87,9% среди всех патогенных вариантов гена *FAH* [773]. Считается, что 4 мутации: *c.1062+5G>A*, *c.554-1G>T*, *c.607-6T>G* и *p.Pro261Leu* составляют 60% патогенных вариантов гена *FAH* в США [521]. Для поиска протяженных делеций и дупликаций гена *FAH* используется метод MLPA, количественная ПЦР, лонг-рэндж ПЦР, либо хромосомный микроматричный анализ [747]. В базе HGMD описано 102 мутации гена *FAH*, приводящие к развитию тирозинемии, тип I [465]. Корреляции между генотипом и фенотипом обнаружено не было. Как острые, так и хронические формы болезни наблюдались у пробандов в одних и тех же семьях с одинаковым набором мутаций. При этом, изучая клетки узелков печени, удаленные у пациентов с хронической формой тирозинемии, тип I, ученые обнаружили, что они иммунологически положительны к белку *FAH* и обладают ферментативной активностью для расщепления фумарилацетоацетата, сделав вывод о существовании механизма спонтанной самокоррекции во время соматического клеточного деления клеток печени у пациентов с тирозинемией, тип I [159, 405]. Такие пациенты обладают более мягким клиническим фенотипом болезни в связи с уровнями фумарилацетогидролазы, близкими к нормальным [289], однако продолжающееся накопление фумарилацетоацетата и сукцинилацетона неизбежно приводит к формированию гепатоцеллюлярной карциномы [519]. По всей видимости, этот механизм определяет отсутствие связи между генотипом и фенотипом пациентов, обладающих одними и теми же мутациями гена *FAH*.

Выявление мутаций также обладает первостепенной важностью при медико-генетическом консультировании членов семьи больного



ребенка, а также во время пренатальной диагностики, так как измерение сукцинилацетона в амниотической жидкости может демонстрировать ложноотрицательные результаты [521].

До 1992 года единственным радикальным методом лечения тирозинемии, тип I была трансплантация печени, которая охватывала не более 10% детей и осложнялась в 10–20% случаев послеоперационной смертностью. Даже при удачной трансплантации прогрессирование поражения почек не останавливалось, требовалась пожизненная иммуносупрессивная терапия. Редуцирующая безбелковая диета лишь тормозила прогрессирование заболевания и позволяла дожить до трансплантации [42]. При ранней манифестации заболевания почти все дети умирали в течение 1 года, при начале заболевания в возрасте от 2 до 6 месяцев 74% детей умирали в течение 6 лет, при появлении симптомов в возрасте старше 6 месяцев в течение 10 лет умирали 38% детей [977].

С 1992 года произошел революционный прорыв в лечении тирозинемии, тип I в связи с появлением препарата Нитизинон (Орфадин*), производства компании ООО «Сведиш Орфан Биовитрум». 2-(2-нитро-4-трифторметилбензол)-1,3-циклогександион (NTBC), одобренный FDA в 2002 году для терапии тирозинемии, тип I [849], тормозит второй этап каскадного пути деградации тирозина путем ингибирования диоксигеназы парагидроксифенилпируватной кислоты, что способствует значительному уменьшению концентрации фумарилацетоацетата и его преобразованию в сукцинилацетон в течение первых суток после приема препарата. Нитизинон обычно назначают в дозе 1,0 мг/кг в сутки. При этом дозировка должна быть скорректирована таким образом, чтобы концентрация нитизинона в крови поддерживалась на уровне от 40 до 60 мкмоль/л, что теоретически блокирует более 99% деятельности диоксигеназы парагидроксифенилпируватной кислоты и обнуляет показатели сукцинилацетона, измеряемые в моче [284]. Обычно суточная доза разбивается на два приема, однако в старшей группе больных она может быть скорректирована до одного приема благодаря длительному периоду полураспада действующего вещества, составляющего 50–60 часов [842]. Терапию нитизиноном необходимо начинать как можно быстрее, в идеальном варианте на доклинической стадии болезни, сразу после постановки диагноза. Параллельно нитизинону назначают диету с минимальным содержанием тирозина и фенилаланина, регулярно контролируя уровень этих аминокислот в крови, так как нитизинон способствует значительному увеличению уровня тирозина в организме больных детей. При надлежащей диетотерапии концентрация тирозина должна быть в пределах 200–500 мкмоль/л, независимо от возраста, тогда как концентрация фенилаланина должна быть в пределах 20–80 мкмоль/л.

В случае снижения фенилаланина ниже 20 мкмоль/л необходимо добавить белок в рацион питания. Открытое исследование 207 пациентов (в возрасте 0–21,7 лет, средний возраст 9 месяцев) продемонстрировало значительное улучшение общей выживаемости у пациентов, болеющих тирозинемией, тип I в возрасте до двух месяцев, принимающих нитизинон и соблюдающих диету, по сравнению с контрольными субъектами (29% против 88% вероятности выживания к двум и четырем годам жизни) [726].

В настоящее время трансплантация печени назначается лишь в редких случаях, таких как выявленные злокачественные образования печени либо острая печеночная недостаточность [120]. Детям с пересаженной печенью рекомендован прием нитизинона в дозе 0,1 мг/кг в сутки для предотвращения почечной тубулопатии и гломерулярной дисфункции в связи с повышенными уровнями сукцинилацетона в плазме крови [121]. Вторичные осложнения, такие как рахит, остеопороз и дефицит карнитина, необходимо контролировать, предупреждать и лечить соответствующими препаратами [725]. Прием нитизинона во время беременности больной матерью способен остановить внутриутробное повреждение печени больных детей, при этом здоровые дети могут оказаться под угрозой изменения метаболизма тирозина [362, 980].

В рамках настоящего исследования были разработаны методы биохимической диагностики тирозинемии, тип I, включающие измерение тирозина, метионина и сукцинилацетона в сухих пятнах крови, и генетической диагностики тирозинемии, тип I; проведен селективный скрининг болезни среди детей с клиническими проявлениями, а также охарактеризованы частоты и спектр выявленных мутаций.

1.2.1. СЕЛЕКТИВНЫЙ СКРИНИНГ ТИРОЗИНЕМИИ, ТИП I У РОССИЙСКИХ ДЕТЕЙ

Разработанный метод определения концентрации сукцинилацетона в пятнах крови, высушенных на фильтровальной бумаге, посредством тандемной масс-спектрометрии позволил провести скрининг 607 пациентов, 342 мальчиков и 265 девочек в возрасте от 5 дней до 14 лет, с подозрением на тирозинемию, тип I. Всем детям были измерены концентрации сукцинилацетона и спектра аминокислот, включающих тирозин, фенилаланин и аланин.

Среди 607 обследованных детей было 53 недоношенных ребенка, у которых было отмечено незначительное повышение аминокислот

в крови, в частности тирозина, аланина и фенилаланина, что может быть связано с ферментативной незрелостью этих детей и низкой функциональной активностью ряда ферментов, например, с белковым перекормом, приводящим к функциональной недостаточности фумарилацетацетазы, кормлении неразведенным козьим молоком и прочее [115]. Это соответствует литературным данным и доказывает невысокую специфичность показателей концентрации тирозина в качестве биомаркера тирозинемии, тип I [956, 1053].

Для корректного измерения концентрации сукцинилацетона в рамках селективного скрининга нами было выбрано значение отрезной точки 2,23 мкмоль/л на основе значений отрезных точек из работ зарубежных авторов [253, 520, 631], а также с учетом полученных нами значений концентрации сукцинилацетона в группах здоровых доноров и пациентов с тирозинемией, тип I. В результате проведенного скрининга повышенная концентрация сукцинилацетона была выявлена у 16 пациентов. Необходимо заметить, что у одного пациента, отобранного после биохимического скрининга, в рамках генетической диагностики был выявлен нуклеотидный вариант *c.1021C>T, p.R341W*, описанный ранее как псевдодефицитный аллель, коррелирующий с повышенным уровнем сукцинилацетона в организме человека в отсутствии тирозинемии, тип I [487], что явилось причиной одного ложноположительного результата. В результате чего у 15 (24,6%) пациентов был подтвержден лабораторный диагноз тирозинемии, тип I.

Согласно полученным данным, были рассчитаны чувствительность и специфичность метода определения концентрации сукцинилацетона. При выбранной отрезной точке, равной 2,23 мкмоль/л, чувствительность метода составила 100%, а специфичность – 99,5%. В результате проведенного ROC-анализа была скорректирована оптимальная отрезная точка для определения концентрации сукцинилацетона. Новое значение отрезной точки составило 2,36 мкмоль/л, что позволило достичь максимальных значений чувствительности (100%) и специфичности (100%).

Для выявления генетической этиологии у 15 пациентов, обнаруженных в результате селективного скрининга, и у шестерых пациентов с тирозинемией, тип I, диагноз которым был поставлен ранее, был разработан метод, позволяющий выявлять мутации в кодирующих и прилегающих интронных областях гена *FAH*, в результате чего удалось подтвердить диагноз у 21 ребенка с тирозинемией, тип I: у 11 (52,4%) девочек и 10 (47,6%) мальчиков. Позднее врачи поставили 14 пациентам клинический диагноз тирозинемия, тип Ib, что соответствует хронической форме тирозинемии, тип I, тогда как одному ребенку был поставлен диагноз тирозинемия, тип Ia.

1.2.2. ГЕОГРАФИЧЕСКИЕ, КЛИНИЧЕСКИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ТИРОЗИНЕМИИ, ТИП I

Для оценки возрастных характеристик обследованных нами российских детей с тирозинемией, тип I суммарно удалось проанализировать данные 18 (85,7%) детей в среднем возрасте 7 лет и 1 месяц (стандартное отклонение 4 года и 2 месяца), медиана 6 лет (от 1 года и 5 месяцев до 17 лет и 10 месяцев) на момент окончания исследования. Диагноз был заподозрен на основе определенных клинических признаков, манифестировавших в среднем в возрасте 8,5 месяцев, медиана 7 месяцев. Средний возраст постановки диагноза составил 3 года и 2 месяца, медиана 2 года и 1 месяц. Средний возраст начала СРТ составил 3 года и 6 месяцев, медиана 2 года и 11 месяцев.

Географические особенности распространения тирозинемии, тип I на территории РФ удалось установить для 95% пациентов, не состоящих между собой в родстве (табл. 35).

Выявленные случаи тирозинемии, тип I, распределились по 16 (18,6%) субъектам РФ с преобладанием в Чечне, Дагестане, Бурятии, Саратовской области и Татарстане (по 2/9,5%). На эти пять субъектов приходится половина описываемых случаев тирозинемии, тип I. В остальных 11 субъектах проживает по одному пациенту с тирозинемией, тип I из когорты российских детей, обследованных нами.

Таблица 35. Распределение обследованных нами пациентов с тирозинемией, тип I в различных субъектах РФ

Субъект	Численность населения	Число семей	Число случаев	Частота в субъекте*
Республика Бурятия	983 276	2	2	1:491 638
Республика Дагестан	3 085 738	2	2	1:1 542 869
Республика Татарстан	3 898 700	2	2	1:1 949 350
Чеченская Республика	1 456 951	2	2	1:728 476
Саратовская область	2 440 729	2	2	1:1 220 365
Республика Саха (Якутия)	966 997	1	1	1:966 997
Ростовская область	4 202 337	1	1	1:4 202 337
Ульяновская область	1 238 424	1	1	1:1 238 424
Санкт-Петербург	5 383 968	1	1	1:5 383 968

Продолжение таблицы 35

Субъект	Численность населения	Число семей	Число случаев	Частота в субъекте*
Нижегородская область	3 214 657	1	1	1:3 214 657
Вологодская область	1 167 719	1	1	1:1 167 719
Свердловская область	4 315 702	1	1	1:4 315 702
Орловская область	739 465	1	1	1:739 465
Рязанская область	1 114 149	1	1	1:1 114 149
Чувашская республика	1 223 395	1	1	1:1 223 395
Москва	12 615 882	1	1	1:12 615 882

Примечание: *На основе выборки пациентов, обследованных в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

При переходе на уровень федеральных округов, становится очевидно, что около половины описываемых случаев тирозинемии, тип I, приходится на Приволжский (7/33,3%) и Северо-Кавказский федеральные округа (4/19%). Обращает на себя внимание тот факт, что в Центральном федеральном округе описано сравнительно мало пациентов с тирозинемией, тип I (3/14,3%) при самой высокой плотности населения. При этом в Дальневосточном федеральном округе, с самой низкой плотностью населения, описано также три случая. В Северо-Западном проживает два (9,5%) пациента, в Уральском и Южном федеральных округах – по одному (табл. 36).

Таблица 36. Распределение обследованных нами пациентов с тирозинемией, тип I в различных федеральных округах РФ

Федеральный округ	Численность населения	Число семей	Число пациентов	Частота в округе*
Приволжский	29 397 227	7	7	1:4 199 604
Северо-Кавказский	9 866 370	4	4	1:2 466 593
Центральный	39 378 947	3	3	1:13 126 316
Дальневосточный	8 188 594	3	3	1:2 729 531
Северо-Западный	13 972 061	2	2	1:6 986 031
Уральский	12 350 131	1	1	1:12 350 131
Южный	16 454 580	1	1	1:16 454 580

Примечание: *На основе выборки пациентов, обследованных в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

Частоты встречаемости различных клинических проявлений тирозинемии, тип I на момент первой госпитализации после постановки диагноза удалось оценить у 20 (95,2%) обследованных пациентов по девяти различным параметрам (рис. 36).

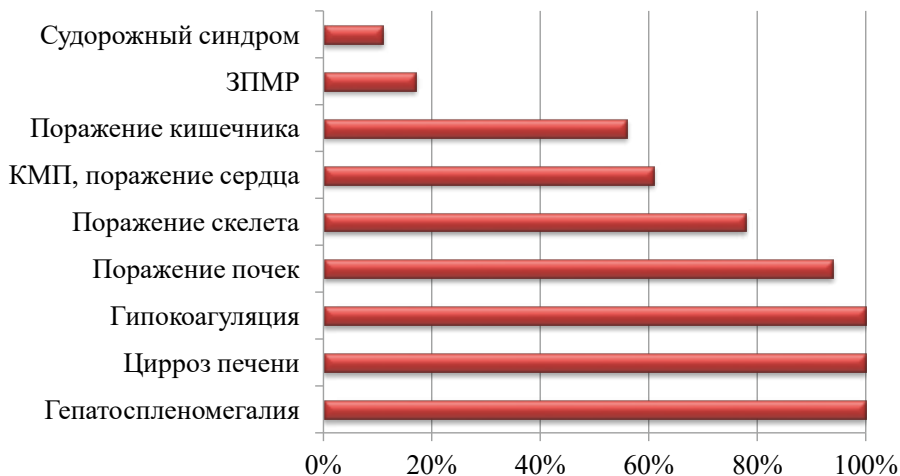


Рис. 36. Частоты девяти различных клинических проявлений тирозинемии, тип I среди обследованных пациентов

У всех обследованных детей, клинические проявления которых удалось описать, были обнаружены гепатоспленомегалия, гипокоагуляция и цирроз печени. У 94% обследованных детей выявлялось поражение почек, у 79% – поражение скелета, у 61% – поражение сердца, в том числе кардиомиопатия, у 56% – поражение кишечника. Задержка психомоторного развития наблюдалась у 17% обследованных детей, а судорожный синдром – у 11%. Фенотип обследованных нами пациентов по большей части совпадал с другими исследованиями [287].

В результате молекулярно-генетического исследования удалось выявить 11 патогенных вариантов гена *FAH*, явившихся причиной развития тирозинемии, тип I у 21 обследованного пациента из 21 российской семьи (рис. 37).

Наиболее частыми мутациями в группе российских детей оказались три мутации. Мутация *c.554-1G>T*, расположенная в шестом интроне гена *FAH* и приводящая к нарушению сплайсинга, обнаружена в 13 (31,0%) случаях у 8 (38,1%) пациентов, проживающих преимущественно в Центральном и Приволжском федеральных округах. Эта мутация считается второй по частоте мутацией в мире с преимущественным распространением в Средиземноморье и на юге Европы, она может приводить к трем различным вариантам мРНК с делецией пяти

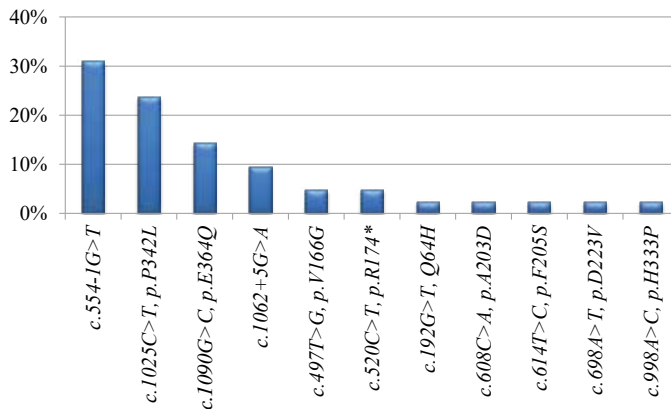


Рис. 37. Относительные частоты и спектр мутаций гена *FAH* у российских детей с тирозинемией, тип I

или 13 нуклеотидов седьмого экзона, либо делецией всего восьмого экзона [94, 265, 553, 565, 995]. Миссенс-мутация *c.1025C>T*, приводящая к замене аминокислотных остатков *p.P342L*, расположенная в экзоне 12 гена *FAH*, найдена на 10 (23,8%) хромосомах у 5 (23,8%) пациентов, проживающих в Северо-Кавказском федеральном округе (трое пациентов из Чечни и двое – из Дагестана). При этом все пятеро пациентов являются представителями чеченского этноса. Мутация *c.1025C>T* была описана ранее лишь у двух пациентов: из Норвегии [810] и из Греции [136]; это характеризует ее как редкую, что вкупе с гомозиготным состоянием патогенного варианта у всех пятерых пациентов может указывать как на эффект основателя в чеченской популяционной группе, так и на значительное накопление этого варианта среди чеченцев, проживающих в Чеченской Республике и Дагестане. К числу частых мутаций у российских детей также можно отнести и миссенс-мутацию *c.1090G>C*, *p.E364Q*, выявленную нами на 6 (14,3%) хромосомах у 3 (14,3%) пациентов. В общей сложности эти три мутации встретились у 16 (69,1%) детей в 29 (76,2%) случаях.

Мутация *c.1062+5G>A*, расположенная в интроне 12 гена *FAH*, может приводить к варианту мРНК с делецией экзона 12, либо к варианту мРНК с делецией экзонов 12 и 13; является наиболее частой мутацией в мире и встречается с частотой 32,3% [94]. Нами она была обнаружена на четырех аллелях (9,5%) у 4 (19,1%) детей из различных регионов России.

Патогенный вариант *c.497T>G*, *p.V166G*, описанный ранее у больных из Северной Европы, стран средиземноморского бассейна и Тур-

ции [136, 298], был обнаружен у девочки армянского происхождения из Ростовской области.

Мутация *c.192G>T, Q64H*, описанная ранее как мутация сайта сплайсинга, считающаяся четвертой по частоте встречаемости мутацией в мире (4,3%) [484], была представлена лишь одним аллелем (2,4%) у одного пациента.

Особенно следует отметить высокую частоту гомозиготных мутаций, встретившихся у 13 (61,9%) пациентов, что может косвенно указывать как на высокую частоту близкородственных браков, так и на высокую встречаемость носительства определенных патогенных вариантов гена *FAH* у российских пациентов.

В структуре 11 различных вариантов гена *FAH*, обнаруженных в результате исследования, значительно преобладали (63,6%) миссенс-мутации, вторыми по частоте были мутации сайтов сплайсинга (27,3%), тогда как нонсенс-мутации были представлены единичным вариантом (9,1%) (рис. 38). Распределение различных типов патогенных вариантов гена *FAH* в целом соответствует распределению, приведенному в базе данных HGMD [465].

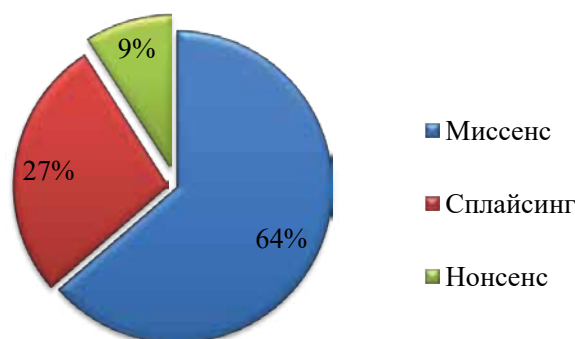


Рис. 38. Доли различных типов мутаций у российских детей с тирозинемией, тип I

1.2.3. ОПИСАНИЕ НОВЫХ ПАТОГЕННЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА *FAH*

У шестерых (28,6%) пациентов удалось обнаружить четыре (36,4%) патогенных варианта гена *FAH*, не описанных до проведения нашего исследования в базе данных HGMD (рис. 39), что пополняет эту базу на 4%.

Чаще других (см. рис. 39) 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 [59], 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 10 000 живых новорожденных [617].

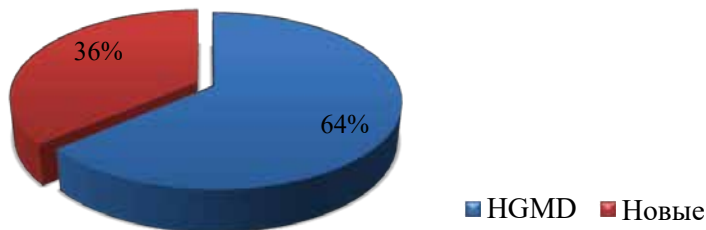


Рис. 39. Соотношение вариантов гена *FAH*, описанных и не описанных ранее в международной базе данных HGMD

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, 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.

1.2.4. МОНИТОРИНГ ТЕРАПИИ ТИРОЗИНЕМИИ, ТИП I

Совместное лечение нитизиноном, низкобелковая диета и детоксикационная терапия направлены на достижение нормальных значений концентрации сукцинилацетона, не допуская при этом роста концентрации тирозина. Двухлетнее мониторирование уровня сукцинилацетона на фоне терапии нитизиноном продемонстрировало отсутствие значений, превышающих границы нормы у всех выявленных нами пациентов [34]. Контроль лечения каждого больного ребенка, осуществляемый посредством регулярного измерения уровней сукцинилацетона и тирозина, позволяет корректировать назначенное лечение в случае превышения референсных значений (рис. 40, 41). Концентрации тирозина, превышающие 600 мкмоль/л, определялись лишь у детей, не соблюдающих диету.

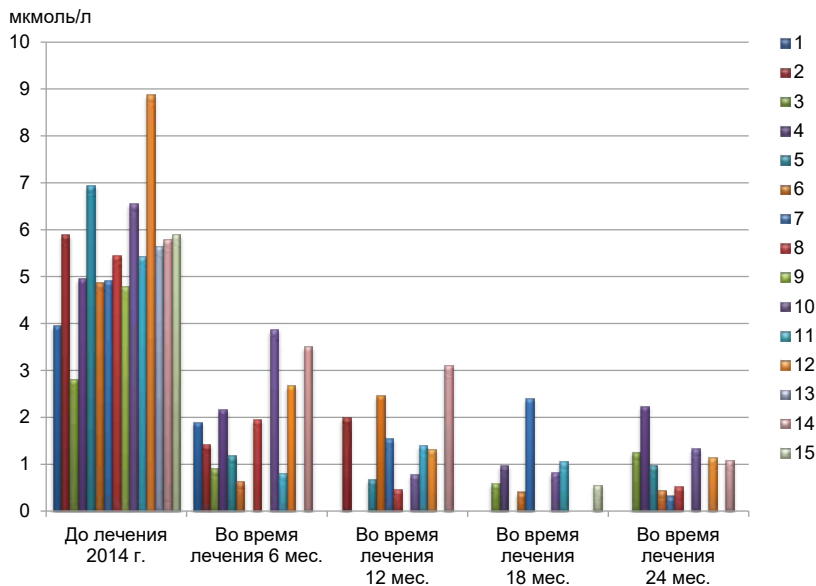


Рис. 40. Изменения показателей сукцилацетона до лечения и во время двухлетней терапии нитизиномом

Примечание. Каждый столбец выделен собственным цветом и соответствует концентрации сукцилацетона у одного из 15 пациентов.

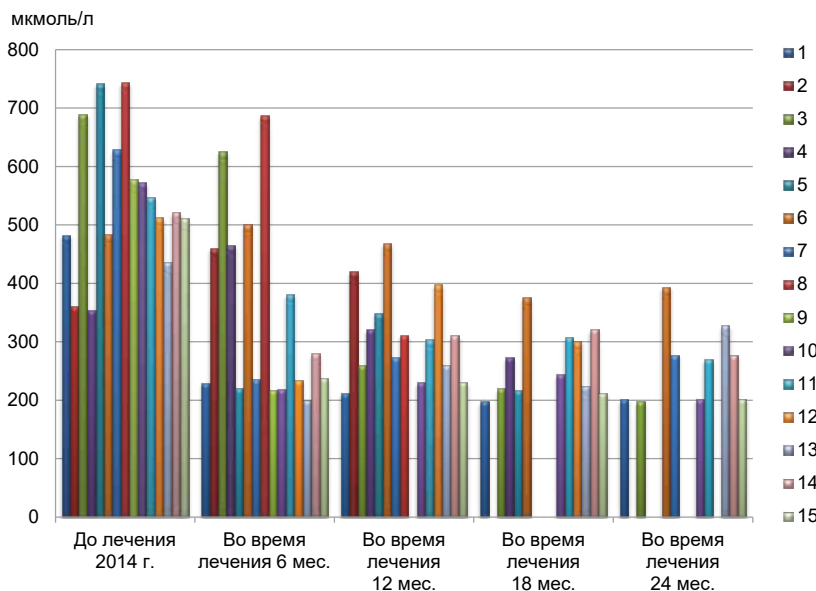


Рис. 41. Изменения показателей тирозина до лечения и на фоне двухлетней диетотерапии

Примечание. Каждый столбец выделен собственным цветом и соответствует концентрации тирозина у одного из 15 пациентов.



Были выявлены достоверные различия в медианных значениях концентрации сукцинилацетона у пациентов с тирозинемией, тип I до проведения и во время проведения субстрат-редуцирующей терапии ($p < 0,001$) (табл. 37), что подтверждает данные зарубежных авторов о том, что этот биомаркер может использоваться в качестве мониторинга проводимой СРТ, причем экскреция сукцинилацетона, не превышающая 1,5 мкмоль/л, соответствует уровню нитизина выше 40 мкмоль/л, что, в свою очередь, соответствует успешному лечению [491].

Также удалось выявить достоверные различия в медианных значениях концентрации тирозина у пациентов с тирозинемией, тип I до проведения диетотерапии и во время ее проведения ($p < 0,001$) (табл. 38), что также подтверждает зарубежные данные о том, что тирозин может использоваться в качестве биомаркера проводимой терапии, причем показатели концентрации тирозина от 200 до 600 мкмоль/л в целом позволяют констатировать успешное лечение [491].

Таблица 37. Расчет достоверности различий в значениях концентрации сукцинилацетона до проведения СРТ и через 6 месяцев после первого приема нитизина

Показатель	До лечения	Во время лечения	р-значение (критерий Уилкоксона)
Концентрация сукцинилацетона, мкмоль/л	5,4 (2,8–8,9)	1,4 (0,8–1,6)	<0,001

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

Таблица 38. Расчет достоверности различий в значениях концентрации тирозина до проведения СРТ и через 6 месяцев после первого приема нитизина

Показатель	До лечения	Во время лечения	р-значение (критерий Уилкоксона)
Концентрация тирозина, мкмоль/л	522,0 (301,0–908,0)	237,7 (178,2–612,0)	<0,001

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

Кроме того, у некоторых обследованных пациентов также наблюдались высокие уровни метионина и длинноцепочечных жирных кислот, которые не так специфичны для тирозинемии, тип I и скорее отражают печеночно-клеточную недостаточность [284].

1.2.5. ОПТИМИЗАЦИЯ АЛГОРИТМА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ТИРОЗИНЕМИИ, ТИП I

Все выявленные мутации распределены в экзонах 3, 6, 8, 12 и 13, а также в интронах 6 и 12 гена *FAH* с наибольшим разнообразием в экзоне 8. В экзонах 1, 2, 4, 5, 9-11 и 14 мутаций выявлено не было (рис. 42).

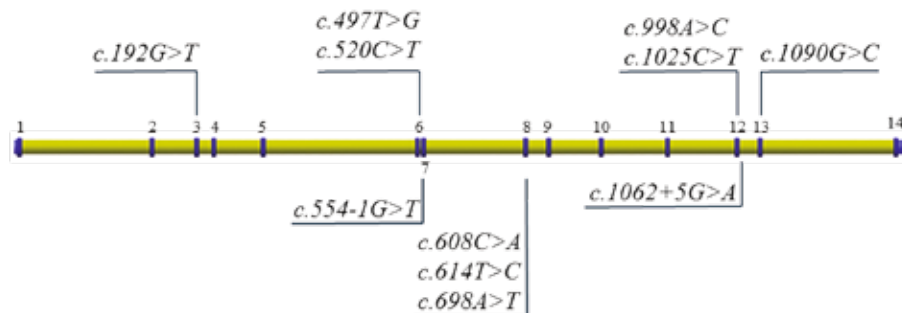


Рис. 42. Структура гена *FAH*(NM_000137.2) и распределение мутаций, выявленных в ходе проведенного исследования

В случае получения лабораторией сухих пятен крови российских пациентов с подозрением на тирозинемию, тип I предлагается следующий алгоритм генетической диагностики.

1. Измерение концентрации сукцинилацетона в сухих пятнах крови методом МС/МС.

2. В случае определения завышенных значений сукцинилацетона – поиск трех наиболее частых мутаций *c.554-1G>T*; *c.1025C>T*, *p.P342L* и *c.1090G>C*, *p.E364Q*, характерных для российских пациентов, что может позволить выявить 69,1% мутаций. Близкое расположение и небольшая протяженность экзонов 6 и 7 гена *FAH* делает возможным их анализ методом Сэнгера посредством одной пары олигонуклеотидов, что может позволить выявить 82,4% мутаций гена *FAH* при анализе экзонов 6, 7, 12 и 13 с помощью трех пар праймеров. При этом с поиска варианта *c.1025C>T*, *p.P342L* необходимо начинать диагностику у пред-

ставителей чеченской популяционной группы, тогда как с варианта *c.1090G>C*, *p.E364Q* – рекомендуется начинать молекулярно-генетическую диагностику у жителей Бурятии и Якутии.

3. В случае невыявления биаллельных мутаций – поиск мутаций во всех кодирующих и прилегающих интронных областях гена *FAN* методом Сэнгера.

1.2.6. ВЫВОДЫ

Разработанные методы биохимической и молекулярно-генетической диагностики НТ, тип I позволили провести исследование биологических образцов, изъятых у 607 пациентов, и выявить 15 (2,5%) 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 *FAN* 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%. Были выявлены мутации, характерные для определенных регионов РФ и определенных этносов, что позволило предложить оптимизацию алгоритма диагностики больных тирозинемией тип I. В частности, мутация *c.1025C>T* гена *FAN*, вызывающая тирозинемия, тип I, характерна для чеченского этноса, а *c.1090G>C* того же гена – для жителей Якутии и Бурятии. Кроме того, удалось описать клинические и возрастные характеристики российских детей с тирозинемией, тип I, продемонстрировав успешность патогенетического лечения пациентов посредством мониторинга уровней сукцинилацетона и тирозина в пятнах крови, высушенных на фильтровальной бумаге. Отдельно следует отметить профилактическое значение разработанных методик, позволивших провести пренатальную диагностику тирозинемии, тип I в трех семьях, отягощенных по этому заболеванию.

1.3. НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ НАКОПЛЕНИЯ ГЛИКОГЕНА

Группа гетерогенных наследственных болезней, причиной развития которых являются мутации в генах, кодирующих белки, способствующие образованию и распаду гликогена в печени, мышцах и других клеточных тканях. Процессы накопления гликогена и его утилизации необходимы для обеспечения тканей энергией и поддержания уровня сахара в крови. Гликоген, обнаруженный французским физиологом

К. Бернаром в 1857 году, являющийся разветвленным гомополисахаридом $(C_6H_{10}O_5)_n$ с молекулярной массой, колеблющейся от 300 до 4000 кДа, состоит из соединенных между собой 6 000–20 000 и более остатков α -D-глюкозы и откладывается в цитоплазме большинства клеток в виде гранул [1044]. В печени гликогена обычно содержится менее 60 г/кг (3–5%), а в мышцах – менее 10 г/кг (0,4–2%), но эти величины могут меняться в зависимости от питания и гормонального статуса. Уменьшение и увеличение ветвления молекулы гликогена катализируется различными ферментами, регулируя тем самым уровень глюкозы в крови. Сначала амилазы расщепляют гликоген, содержащийся в пище, до декстринов, затем до мальтозы и глюкозы. Избыток глюкозы, поступающий в кровь, включается в синтез гликогена, откладываясь в тканях, где происходит фосфоролитическое расщепление внутриклеточного гликогена под действием фосфорилаз, последовательно отщепляющих от молекулы гликогена остатки глюкозы с образованием глюкозо-6-фосфата, вовлеченного в процесс гликогенолиза. Основным путем внутриклеточного превращения глюкозы в гликоген является фосфорилирование глюкозы под действием гликогенсинтетазы. Соответственно, содержание гликогена в тканях зависит от содержания глюкозы в крови, а также соотношения активностей гликогенсинтетазы и фосфорилазы. По достижении максимальной величины содержания гликогена в тканях его синтез прекращается, а избыточное количество глюкозо-6-фосфата при этом в первую очередь направляется на производство триглицеридов для хранения энергии в виде жира.

Ориентировочная суммарная частота болезней накопления гликогена составляет 1 случай на 20 000–43 000 живых новорожденных [743]. В международной базе данных ОМIM описано 16 типов генетически обусловленных гликогенозов, классифицируемых на основе ферментативного дефекта и преимущественного поражения той или иной ткани. Гликогеновые болезни (ГБ) прежде всего повреждают печень (типы I, IIIв, 0, XI, IX, VI и IV), либо мышцы (II, IIIа, V, VII, IXd X, XII, XIII и XIV), либо и то и другое (III и IXb) [984]. В 1929 году патологоанатом Эдгар фон Гирке впервые описал гликогеноз, обнаружив гликоген в печени больших размеров и в почках после вскрытия двух умерших пациентов, назвав это заболевание «гепатонефромегалия гликогеника» [994]. В 1952 году однофамильцы Кори обнаружили дефицит печеночной глюкозо-6-фосфатазы не у всех пациентов со схожими клиническими проявлениями болезни, что натолкнуло их на мысль о гетерогенности гликогеновых болезней [258]. Доказательством этого предположения явилась работа Нарисавы и соавторов, которым в 1978 году удалось идентифицировать недостаточность внутриклеточного транспортера глюкозо-6-фосфата [704]. Эти открытия помогли разделить гликоге-



новую болезнь, тип I на подтипы ГБ, тип Ia (ОМIM 232200) и ГБ, тип Ib (ОМIM 232220). Позднее удалось идентифицировать дефекты двух других транспортеров: переносчика неорганических фосфатов из эндоплазматического ретикулума в цитоплазму и пирофосфатов в обратном направлении, а также переносчика свободных молекул глюкозы из эндоплазматического ретикулума в цитоплазму. Их недостаточность вызывает ГБ, тип Ic (ОМIM 232240) [240, 243].

1.3.1. ГЛИКОГЕНОВЫЕ БОЛЕЗНИ С ПРЕИМУЩЕСТВЕННЫМ ПОРАЖЕНИЕМ ПЕЧЕНИ

1.3.1.1. Гликогеновая болезнь, тип I. Болезнь Гирке

Первопричиной развития ГБ, тип Ia является патогенное изменение референсной последовательности нуклеотидов гена *G6PC* (ОМIM 613742), кодирующего глюкозо-6-фосфатазу, сниженная активность которой приводит к накоплению гликогена, преимущественно в печени и почках. То есть при снижении уровня глюкозы в крови не происходит ее восполнение за счет превращения гликогена в глюкозу, а значит, организм не способен поддерживать нормальные уровни глюкозы между приемами пищи. Глюкозо-6-фосфатаза не способна катализировать отщепление свободной глюкозы от глюкозо-6-фосфата на терминальной стадии гликогенолиза (процесс расщепления гликогена до глюкозы) и глюконеогенеза (процесс образования глюкозы из углеводовных компонентов), что приводит к устойчивой гипогликемии вследствие минимального поступления в кровь глюкозы. Подавление гликогенолиза и глюконеогенеза заставляет организм человека адаптироваться к низким уровням инсулина и повышенной секреции глюкагона. Повышенные уровни глюкозо-6-фосфата приводят к повышенной активности пентозофосфатного пути (PPP), а также увеличивают синтез пирувата. Увеличенные уровни пирувата приводят к увеличению производства лактата посредством лактатдегидрогеназы (LDH) и аланина посредством аланинтрансаминазы (ALT). Кроме того, повышенное окисление пирувата посредством комплекса пируватдегидрогеназы (PDHc) приводит к увеличению производства ацетил-КоА, который, в свою очередь, используется для увеличенного синтеза жирных кислот и холестерина. Повышенные уровни глюкозо-6-фосфата также стимулируют увеличенное производство глицерол-3-фосфата посредством действия глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (GPD1). Повышенные уровни глицерол-3-фосфата и жирных кислот приводят к увеличению синтеза триглицеридов, которые, в сочетании с повышенным холесте-

рином, приводят к гиперлипидемии, а также жировой инфильтрации гепатоцитов, способствуя развитию гепатомегалии и цирроза печени (рис. 43).

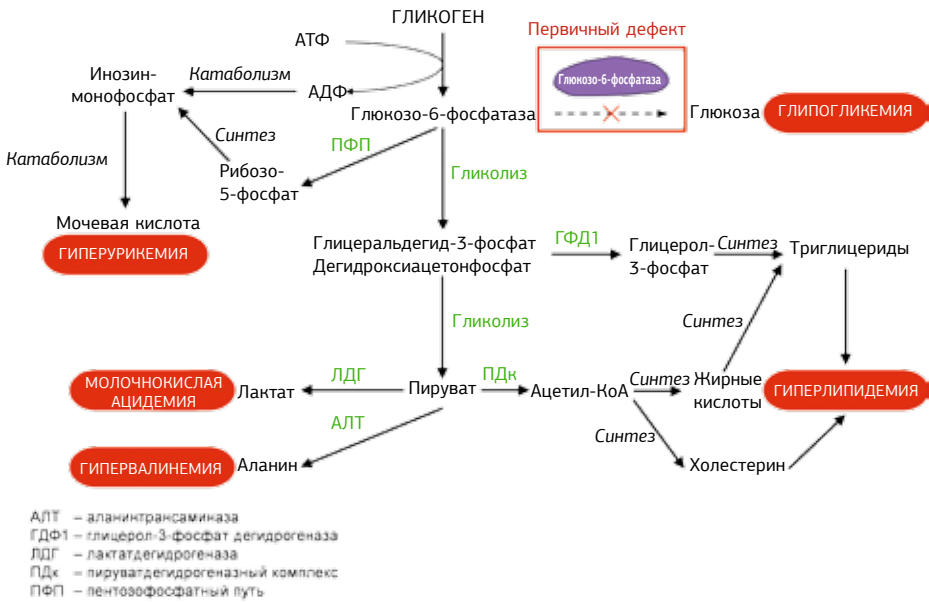


Рис. 43. Метаболические нарушения, возникающие при ГБ, тип I

Первые признаки и симптомы ГБ I в 50% случаев появляются в возрасте от 1 до 6 месяцев [787], когда дети иногда могут спать всю ночь, не просыпаясь для приема пищи. Повышенное содержание молочной кислоты в кровяном русле обуславливает устойчивый ацидоз, связанный с повышенным содержанием ионов натрия, калия и кальция, тогда как избыточное накопление гликогена постепенно приводит к печеночной и почечной недостаточности. На первом году жизни, как правило, в возрасте 3–6 месяцев, развивается тяжелая гипогликемия и гепатомегалия в 100% случаев; а иногда гепатомегалия развивается пренатально и диагностируется визуально сразу после родов [348]. Позднее развивается задержка роста (90%), гиперурикемия (89%), анемия (81%), протеинурия или микроальбуминурия (67%), кальциноз почек (65%), остеопения (27%), гиперлактатацидемия, гиперлипидемия и аденома печени (75%). При этом на биохимическом уровне в 100% случаев значительно повышены уровни триглицеридов, в 93% случаев – концентрации гамма-глутамилтрансферазы, в 61% случаев – щелочной фосфатазы и в 76% случаев – уровня холестерина в сыворотке крови [917]. У некоторых детей развивается нефромегалия, понос и отложения холестерина в кожном матриксе (ксантомы). В позднем подростковом

возрасте может развиваться подагра, возникающая в результате накопления кристаллов мочевой кислоты в суставах, поликистоз яичников и легочная гипертензия [480]. Кроме того, у некоторых пациентов с ГБ I наблюдается уменьшение минеральной плотности костной ткани [673].

Ген *G6PC*, длиной 12,5 т.п.н. и расположенный в хромосомной области 17q21, состоит из 5 экзонов и кодирует белок длиной 357 аминокислотных остатков с молекулярной массой 63 кДа. Приблизительная частота патогенных вариантов этого гена составляет 1 случай на 100 000 живых новорожденных с механизмом передачи в ряду поколений, носящих аутосомно-рецессивный характер [243]. Наибольшей частотой ГБ, тип Ia обладает в популяции евреев ашкенази, составляя 1 случай на 20 000 живых новорожденных, что как минимум в 5 раз превышает общепопуляционный уровень заболеваемости [305]. При этом носителем болезни является каждый 75-й человек описанной популяции [537]. К настоящему времени база HGMD включает 111 патогенных вариантов гена *G6PC*, приводящих к возникновению ГБ, тип Ia. Большинство этих мутаций составляют миссенс/нонсенс мутации (84 (76%)), кроме них описаны 20 небольших делеций/инсерций, суммарная встречаемость которых не превышает 18%, и лишь 7 мутаций (6%) составляют мутации, приводящие к нарушению сплайсинга гена *G6PC* [466]. Самыми частыми мутациями гена *G6PC* среди европеоидов считаются: *p.R83C*, встречающаяся в 33% случаев, и *p.Q347X*, встречающаяся в 18% случаев; среди монголоидов: *c.648G>T*, встречающаяся в 54% случаев у китайцев, в 75% случаев у корейцев и в 91% случаев у японцев; среди латиноамериканцев: *c.380_381insTA*, встречающаяся в 54% случаев [241].

Первопричиной развития ГБ, тип Ib служат мутации гена *SLC37A4* (OMIM 602671), приводящие к сниженной активности кодируемого им микросомального переносчика глюкозо-6-фосфата G6PT. Ген *SLC37A4*, длиной 5,3 т.п.н., состоящий из 9 экзонов, расположен в хромосомной области 11q23 и кодирует белок, состоящий из 427 аминокислотных остатков с молекулярной массой 46 кДа. Считается, что ГБ, тип Ib встречается в 1 случае на 100 000 живых новорожденных [527]. К настоящему времени в базе HGMD описано 107 патогенных вариантов гена *SLC37A4*, чуть более половины (54%) которых составляют миссенс/нонсенс мутации, 29 (27%) небольших делеций/инсерций и 18 (17%) вариантов гена оказывают влияние на сплайсинг. Считается, что ГБ, тип Ic также вызывается мутациями в гене *SLC37A4* [224, 243].

Основной функцией внутриклеточного переносчика глюкозо-6-фосфата является транспорт глюкозо-6-фосфата из цитоплазмы в эндоплазматический ретикулум. На мембране эндоплазматического ретикулаuma располагается глюкозо-6-фосфатаза, кодируемая геном *G6PC*, которая отщепляет фосфат от глюкозо-6-фосфата (рис. 44).

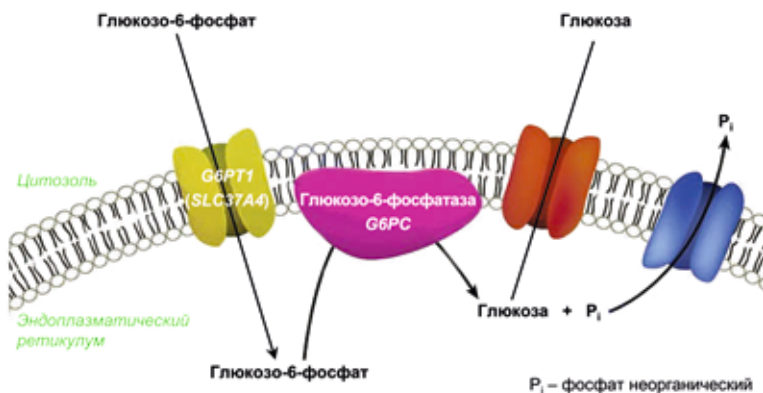


Рис. 44. Механизм транспорта и расщепления глюкозо-6-фосфата в эндоплазматическом ретикулуме

Патогенные варианты гена *SLC37A4* приводят к частичной либо к полной потере способности транспортера глюкозо-6-фосфата переносить глюкозо-6-фосфат к месту его расщепления, вследствие чего накапливается гликоген, избыточное количество которого становится токсичным, постепенно повреждая органы и ткани, в особенности печень, почки и тонкий кишечник, что приводит к клиническим проявлениям ГБ, тип Iб, схожим с клиническими проявлениями ГБ, тип Ia. Принципиальным отличием клинической картины ГБ, тип Iб являются характерные эпизоды нейтропении, придающие больным особую восприимчивость к бактериальным грамположительным инфекциям. Многие больные страдают воспалительными заболеваниями стенок кишечника и полости рта. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что митохондриальный перенос глюкозо-6-фосфата играет определенную роль в антиоксидантной защите нейтрофилов [518], а значит, генетический дефект транспортера глюкозо-6-фосфата может привести к нарушению функции нейтрофилов и, как следствие, к их апоптозу [242], что и приводит к развитию нейтропении.

Описано несколько случаев развития мягкой формы нейтропении у пациентов с ГБ, тип Ia, имеющих мутацию *p.G188R* гена *G6PC* в гомозиготном состоянии [1016]. Компонд-гетерозиготное состояние этой мутации не сопровождалось нейтропенией. У пациента с гомозиготной мутацией *p.P257L* гена *G6PC* и остаточной активностью фермента чуть более 6% ни разу не наблюдались эпизоды гипогликемии [916]. Самая частая у представителей Японии и Кореи синонимичная сплайсинговая гомозиготная мутация *c.648G>T* гена *G6PC*, как правило, описывается при мягком фенотипе ГБ, тип Ia и приводит к развитию карциномы печени во взрослом возрасте [642, 697]. При этом следует заметить,

что первые две фенотипические корреляции описаны для единичных случаев и не обладают доказательной базой на большой выборке больных в силу редкости болезни и редкости самих мутаций, тогда как исследование 40 пациентов с мутацией с.648G>T гена *G6PC* показало, что не существует строгих корреляций ни с возрастом манифестации, ни с тяжестью симптомов, ни с осложнениями болезни [77].

Для пациентов с ГБ, тип Iб не было выявлено строгих корреляций ни с одним генотипом гена *SLC37A4* [658]. Отсутствие строгих корреляций наряду с гетерогенностью клинических проявлений у носителей одинаковых генотипов может указывать на другие факторы, способные модифицировать фенотип конкретного больного.

Инструментальная диагностика ГБ, тип I включает ультразвуковое обследование брюшной полости, позволяющее дать обоснованную оценку размеров печени и почек. Лабораторная диагностика ГБ, тип I включает биохимическое определение глюкозы в крови с электролитами с последующим определением уровня лактата в плазме крови. Кроме того, измеряют уровень мочевой кислоты в плазме крови и клиренс креатинина в моче. Измерение активности глюкозо-6-фосфатазы применяется все реже, в связи с очевидными сложностями, возникающими при заборе биопсийного материала. Этот метод прямой диагностики ГБ, тип I все чаще заменяется секвенированием всех кодирующих и прилегающих интронных областей генов *G6PC* и *SLC37A4*, которое позволяет выявить первопричину развития этих наследственных состояний, а также осуществить диагностику выявленных мутаций в отягощенных семьях с целью проведения пренатальной и преимплантационной диагностики в случае необходимости.

В 2002 году Европейский консорциум специалистов разработал общие рекомендации для лечения пациентов с ГБ, тип I [787]. Основное действие терапии направлено на поддержание нормогликемии и на предотвращение появления вторичных метаболических расстройств. Для этого младенцев кормят через назогастральный или гастростомический зонд, а детям постарше рекомендуют диету с большим содержанием кукурузного крахмала, которая препятствует быстрому высвобождению глюкозы. Так, детям в возрасте 2–3 лет ночные кормления обычно заменяются приемом кукурузного крахмала перед сном и рано утром в том случае, если амилаза, вырабатываемая поджелудочной железой, достигает достаточной активности. Кроме того, существуют препараты, разработанные на основе генно-модифицированного кукурузного крахмала, позволяющие удерживать сахар в крови на нужных значениях дольше, чем в случае применения немодифицированного кукурузного крахмала [263]. При этом потребление галактозы и фруктозы должно быть максимально ограничено, так как они увеличивают

содержание молочной кислоты, не повышая уровень глюкозы. Для предотвращения возникновения нефропатии и подагры часто рекомендуется использование аллопуринола. Как для предотвращения анемии, так и в целях профилактики рекомендован регулярный прием железа. Триглицеридемия заставляет пациентов с ГБ, тип I избегать повышенного потребления липидов с пищей [274]. Еженедельное введение гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, запускающего производство, созревание, миграцию и цитотоксичность нейтрофилов, имеет решающее значение для предотвращения или уменьшения случаев тяжелой инфекции, регулярно возникающих у пациентов с ГБ, тип Ib, а также может отсрочить либо вовсе предотвратить симптомы псевдоколита. Кроме того, раннее начало и продолжительное лечение гранулоцитарным колониестимулирующим фактором положительно коррелирует с процессом минерализации костей [659]. Это единственный препарат, рекомендованный к еженедельному и постоянному употреблению пациентам с ГБ, тип Ib. Для пациентов с ГБ, тип Ia подобных рекомендаций не существует ни по одному препарату. Рекомендовано ежегодное ультразвуковое обследование печени пациентам с ГБ, тип I для своевременного удаления аденомы в случае необходимости. В редких случаях осуществляется пересадка печени.

В последнее время проводятся эксперименты на животных моделях для разработки генной терапии в целях лечения пациентов с обеими формами ГБ, тип I [538].

Продолжительность жизни пациентов с ГБ, тип I варьирует в широком диапазоне от нескольких месяцев до 70 и более лет в зависимости от тяжести болезни и адекватности надлежащего лечения [209]. Изучение механизмов развития данного состояния, поддержание нормогликемии и медикаментозное купирование характерных вторичных метаболических расстройств позволило значительно улучшить прогноз для больных ГБ, тип I [241], поэтому ранняя диагностика ГБ, тип I важна не только для своевременной постановки диагноза и профилактических действий, направленных на предотвращение возникновения повторных случаев болезни в отягощенных семьях, но и для разработки современной патогенетической терапии.

1.3.1.2. Гликогеновая болезнь, тип III. Болезнь Форбса. Болезнь Кори

Редкое моногенное наследственное заболевание, возникающее и прогрессирующее по причине гомозиготных и компаунд-гетерозиготных мутаций в гене *AGL*, кодирующем девятый фермент, недостаточность которого приводит к накоплению гликогена аномальной



структуры клетками печени, скелетными и сердечными мышцами. Наследование мутаций происходит по аутосомно-рецессивному типу. На эту форму приходится около 24% всех случаев ГБ. Средняя частота ГБ, тип III в Америке составляет 1 случай на 100 000 живых новорожденных, тогда как в Европе болезнь встречается в 1 случае на 83 000 живорожденных [559]. Среди инуитов Северной Америки и сефардских евреев североафриканского происхождения отмечена гораздо более высокая частота ГБ, тип III: 1 : 5066 и 1 : 5400 соответственно [1061], тогда как наибольшая частота болезни к настоящему времени зафиксирована среди коренного населения Фарерских островов: 1 случай на 3600 живых новорожденных [826]. Во всех трех популяционных группах высокая распространенность болезни, по всей видимости, связана с эффектом основателя.

В 1928 году Снэпс и ван Кревельд первыми описали двух больных с ГБ, тип III [887], а в 1952 году Иллингуорт и Кори выделили гликоген из тканей третьего пациента с ГБ, тип III, описанного позднее Форбсом [339], показав, что гликоген, содержащийся в печени и мышечных тканях, имеет аномальную структуру благодаря коротким внешним цепям [486]. Эта структура была названа лимит-декстрином для обозначения молекул гликогена, которые были расщеплены фосфорилазой, ферментом, расщепляющим α -1,4-гликозидные связи наружных неразветвленных цепей молекулы гликогена, и не расщеплены деветвящим ферментом, расщепляющим α -1,6-гликозидные связи, формирующие точки ветвления исходной молекулы гликогена [73]. В 1956 году предположение об отсутствии деветвящего фермента, расщепляющего α -1,6-гликозидные связи, было подтверждено теми же исследователями [485]. А в 1964 году впервые удалось провести сравнительное количественное измерение активности деветвящего фермента в лейкоцитах здоровых людей и в лейкоцитах тех самых первых пациентов с ГБ, тип III, описанных ван Кревельдом в 1928 году [460].

Гликоген представляет собой полимер глюкозы, в котором большинство остатков глюкозы связаны друг с другом с помощью α -1,4-гликозидных связей с образованием неразветвленных, линейных цепей молекулы, которые связываются между собой с помощью α -1,6-связей и формируют разветвленную структуру гликогена (рис. 45).

При этом ветвление линейных цепей гликогена происходит при связывании каждых 4–10 остатков глюкозы [486]. Когда уровень глюкозы в крови падает, запасенный печенью гликоген посредством каскада различных гидролитических реакций катаболизируется до глюкозы и глюкозо-1-фосфата. Полная деградация гликогена возможна при согласованном действии всех участвующих ферментов. Сначала фосфорилаза удаляет остатки глюкозы, соединенные между собой 1,4-глико-

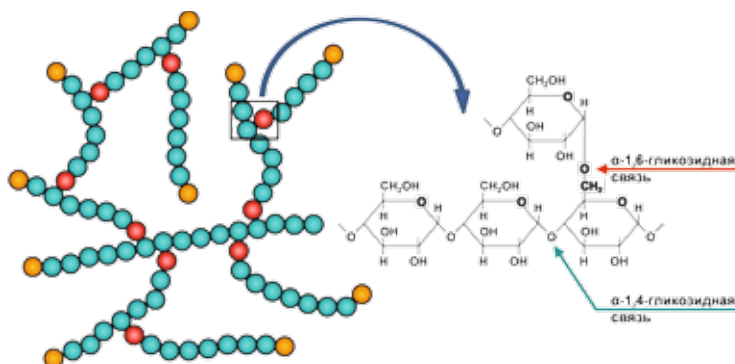


Рис. 45. Структура молекулы гликогена, формируемого остатками глюкозы, связанными 1,4- и 1,6-связями

зидными связями, один за другим с неразветвленных наружных цепей молекулы гликогена до тех пор, пока не останутся 4 глюкозные единицы вплоть до места разветвления молекулы в точке формирования 1,6-гликозидных связей. Затем в работу вступает деветящий фермент, кодируемый геном *AGL*, расположенным в хромосомной области 1p21.2 и состоящим из 85 т.п.н. и 34 кодирующих экзонов [114]. Деветящий фермент представляет собой достаточно крупный белок, состоящий из 1532 аминокислот с молекулярной массой около 170 кДа. Этот фермент необычен тем, что он является одним из немногих белков с двумя независимо функционирующими центрами каталитической активности, расположенными на отдельных участках одной полипептидной цепи. А значит, этот фермент может работать как трансфераза, перенося 3 оставшиеся глюкозные единицы из 4-х с короткой цепи молекулы гликогена в конец смежной цепи за счет каталитической активности 1,4- α -D-глюкан 4- α -глюканотрансферазы, и как гликозидаза, удаляя последнюю глюкозную единицу за счет активности амило- α -1,6-глюкозидазы (рис. 46).

Недостаточность деветящего фермента приводит к накоплению токсичного лимит-декстрина на фоне значительного снижения содержания глюкозы, что и приводит к развитию гипогликемии, даже после относительно короткого периода голодания [449]. В большинстве случаев гипогликемия не настолько тяжелая, как в ГБ, тип I, по причине нормально функционирующего глюконеогенеза, однако в редких случаях она может вызывать судороги, повреждения головного мозга и даже летальный исход [108]. Возраст возникновения первых клинических проявлений резко варьируется от пациента к пациенту. Гипогликемия редко встречается у новорожденных, но часто проявляется в возрасте 3–4 месяцев, когда многие родители снижают частоту корм-

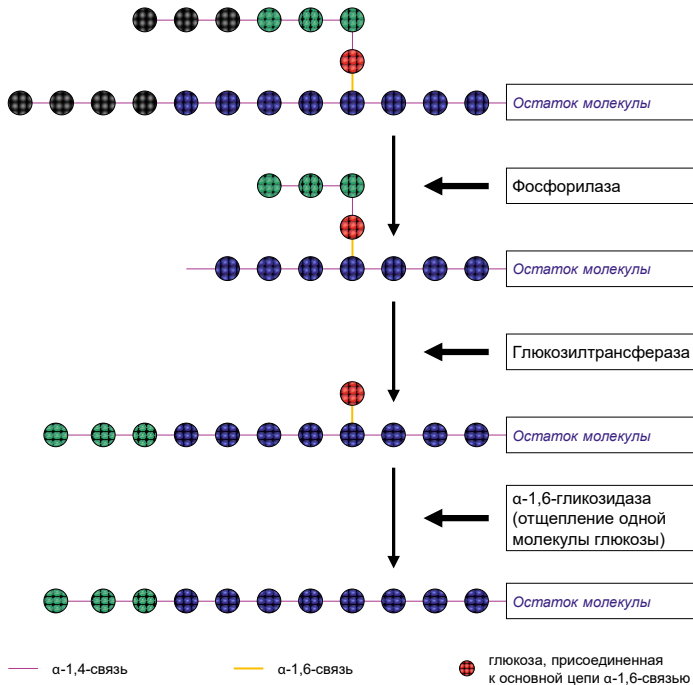


Рис. 46. Расщепление молекулы гликогена фосфорилазой и деветящим ферментом, сниженная активность которых вызывает ГБ, тип VI и ГБ, тип III соответственно

ления. Печеночные симптомы могут быть настолько незначительными, что диагноз ставится лишь во взрослой жизни, когда пациент впервые проявляет признаки и симптомы нервно-мышечных заболеваний [416].

В зависимости от активности каталитических единиц и локализации дефицитного фермента выделяют 4 подтипа ГБ, тип III: IIIa, IIIb, IIIc и IIId [559, 869]. Приблизительно 85% больных имеют дефицит деветящего фермента как в печени, так и в мышцах (подтип IIIa), однако примерно у 15% пациентов дефицит выявляется только в печени (подтип IIIb). Наличие указанных подтипов объясняется различной экспрессией фермента в разных тканях. В редких случаях селективное снижение активности либо амило-1,6-глюкозидазы, либо 1,4- α -D-глюкан 4- α -глюканотрансферазы приводит к развитию подтипов IIIc и IIId болезни соответственно. Пациенты с ГБ IIIa имеют дефицит активности деветящего фермента в печени, скелетных мышцах, сердце, эритроцитах и культивированных фибробластах. Исследования показали, что прогрессирующая миопатия и/или кардиомиопатия развиваются только у больных с этой общей недостаточностью деветящего фермента. Пациенты с ГБ IIIb имеют дефицит активности деветящего

фермента в печени и нормальную активность в мышцах. ГБ, тип IIIc описана единичными случаями с неполным описанием клинических проявлений, заключающихся в гепатомегалии, отсутствии гипогликемии и клинически значимого повреждения мышц в одном исследовании [98] и упоминания о том, что ГБ, тип IIIc развивается преимущественно в мышечной ткани – в другом исследовании [93]. Пациенты с ГБ IIIc имеют сниженную активность амило-1,6-глюкозидазы и нормальную активность 1,4- α -D-глюкан 4- α -глюканотрансферазы. Пациенты, страдающие ГБ, тип IIId, клинически неотличимы от пациентов с ГБ, тип IIIa и имеют сниженную трансферазную активность деветвящего фермента как в печени, так и в мышечных тканях; при этом глюкозидазная активность деветвящего фермента остается в пределах референсных общепопуляционных значений [908].

Манифестация ГБ, тип III зачастую начинается на первом году жизни с гепатомегалии, которая является наиболее распространенным клиническим признаком ГБ, тип III [528]. Клиническая картина пациентов с ГБ, тип IIIa и IIId сопровождается более тяжелыми проявлениями ГБ по сравнению с пациентами, страдающими ГБ, тип IIIb. Большинство больных детей имеют замедленные темпы роста в раннем детстве, при этом почти все дети достигают нормальных показателей роста в период половой зрелости за счет поддержания уровня глюкозы в крови в пределах референсных значений. Хронические осложнения печени, включающие цирроз печени и аденому или гепатоцеллюлярную карциному, развиваются у 11% больных ГБ, тип III [860]. При ГБ IIIa и IIId атрофия и слабость мышц развиваются в 34% случаев и начинают проявляться при достижении пациентами второго или третьего десятилетия жизни. Дилатационная / гипертрофическая кардиомиопатия и другие сердечно-сосудистые заболевания развиваются у 15% и 58% больных ГБ IIIa и IIId соответственно как в раннем детстве, так и при достижении третьего и четвертого десятилетия жизни. Сахарный диабет 2-го типа развивается у 9% взрослых пациентов с ГБ, тип III [860]. При этом до сих пор ни одна выдвинутая теория, объясняющая улучшение состояния большинства пациентов с возрастом или даже исчезновения признаков и симптомов ГБ, тип III после полового созревания, не получила весомых доказательств. Повреждение печени и мышц, как правило, объясняют приступами гипогликемии, так как не могут найти доказательств любым другим объяснениям, таким как накопление аномально структурированного гликогена [339]. В младенчестве и раннем детстве у некоторых пациентов, страдающих ГБ, тип III, может развиваться и гиперлипидемия, а значит, клинические проявления ГБ, тип I и ГБ, тип III у детей в возрасте 3–8 лет могут быть практически неотличимы. При этом гипогликемия, развивающаяся у пациентов с ГБ, тип III после



короткого голодания, сопровождается образованием кетоновых тел, что не встречается у пациентов с ГБ, тип I [449]. В отличие от предыдущих отчетов, описывающих клинические проявления ГБ, тип III [528, 559], многоцентровые исследования последних лет показывают, что гипогликемия является симптомом всего у половины пациентов. А значит, у больных с гепатомегалией, гиперлипидемией и повышенными значениями трансаминаз диагноз ГБ, тип III нельзя исключать в отсутствие зафиксированных эпизодов гипогликемии. Тяжелая умственная отсталость и смертность вследствие метаболического расстройства являются редкостью для пациентов с ГБ, тип III. Наиболее важным различием механизмов развития ГБ, тип I и ГБ, тип III с клинической точки зрения является фундаментальное различие в механизмах метаболической компенсации между пациентами с ГБ, тип I (альтернативный лактат накапливается быстро; отсутствие кетоновых тел) и пациентов с ГБ, тип III (глюконеогенез незатронут; постепенное формирование кетоновых тел) во время голодания.

Диагностика ГБ, тип III включает методы инструментальной и лабораторной диагностики. К методам инструментальной диагностики, используемой для выявления нарушений, характерных для ГБ, тип III, относятся УЗИ печени и брюшной полости для оценки размеров печени и выявления аденомы и гепатоцеллюлярной карциномы. Электрокардиографию и эхокардиографию проводят для выявления ГБ, тип IIIa в связи с увеличением числа случаев прогрессирующей сердечной гипертрофии с риском развития аритмии и сердечной недостаточности, связанной с гипертрофической кардиомиопатией [108]. Электромиография применяется для раннего выявления миопатии и скорости ее прогрессирования. Гистологические исследования выявляют увеличение гепатоцитов у пациентов с ГБ, тип III за счет накопления лимитдекстрина и позволяют различить ГБ, тип I и ГБ, тип III за счет отсутствия либо минимального накопления жира в печени больных ГБ, тип III. Лабораторная диагностика начинается с последовательных измерений уровня глюкозы в крови, коррелирующих со временем последнего кормления, принимая во внимание способность поддержания нормального уровня глюкозы в течение нескольких часов после кормления за счет незатронутого процесса глюконеогенеза. В раннем детстве показательными могут являться исследования уровней протромбина (только у больных с фиброзом и/или циррозом печени) и трансаминаз, которые зачастую возвращаются к референсным значениям в подростковом периоде. Измерение уровней лактата в крови и мочевой кислоты в моче после короткого периода голодания демонстрирует небольшое превышение допустимых значений. Более показательным биохимическим исследованием может являться измерение кетонов в крови и моче

после короткого периода голодания [621]. Большинство пациентов с ГБ IIIa имеют завышенные уровни креатининкиназы в сыворотке крови, при этом нормальные уровни креатининкиназы, выявленные в раннем детстве, не могут исключать дефицит деветвящего фермента в мышечной ткани в связи с поздним вовлечением мышечной ткани в развитие патологии. Наиболее достоверными методами лабораторной диагностики являются измерения активности деветвящего фермента в печени и мышечных тканях, а также молекулярно-генетическое исследование гена *AGL*. К настоящему времени в базе HGMD описано 178 патогенных вариантов гена *AGL*. Большинство их разнообразия составляют делеции / дупликации 75 (42,1%), миссенс- и нонсенс-мутаций выявлено 67 (37,6%), на сплайсинговые варианты приходится 28 (15,7%) описанных мутаций, остальные виды мутаций составляют 4,5% [462].

Поиск фенотипических корреляций при ГБ, тип III является чрезвычайно активной областью исследований. Различные мутации в гене *AGL* могут приводить к развитию ГБ IIIa – ГБ IIId (рис. 47) [860].

В большинстве случаев это объясняется пространственной структурой кодируемого белка и наличием центров каталитической активности, кодируемых определенными экзонами, однако в некоторых случаях ни один из известных механизмов не может объяснить, как, например, две различные мутации одного кодона экзона 3, не кодирующего сайт каталитической активности, снижают активность фермента в печени и не оказывают существенного влияния на активность фермента в мышцах, приводя к развитию ГБ, тип IIIb [394, 869]. Недавно ученым удалось обнаружить и корреляцию мутации *p.R1147G* гена *AGL*, с изолированным дефицитом амило-1,6-глюкозидазы, вызвавшим развитие ГБ, тип IIIc у 12-летней турецкой девочки [98], а также корреляцию мутации *p.L620P* с изолированным дефицитом α -D-глюкан 4- α -глюканотрансферазы и развитием ГБ, тип IIId [318]. При этом не выявлено статистически достоверных корреляций между не миссенс-мутациями и тяжестью миопатии, сердечными и печеночными осложнениями среди взрослых пациентов с ГБ, тип III, однако ученые полагают, что миссенс-мутации гена *AGL* сопровождают более мягкое течение болезни, не вызывающее значительное снижение ферментативной активности [860]. И этим объясняют небольшой процент миссенс-мутаций по сравнению с другими метаболическими болезнями и недовыявляемость этой формы ГБ.

Тщательно соблюдаемое диетическое питание для поддержания необходимых уровней глюкозы в крови является наилучшим средством лечения большинства гликогеновых болезней. Для лечения младенцев с ГБ, тип III в первую очередь используют частые дневные кормления и назогастральные зонды для ночного кормления. При достижении трехмесячного возраста назогастральные зонды заменяют кормле-

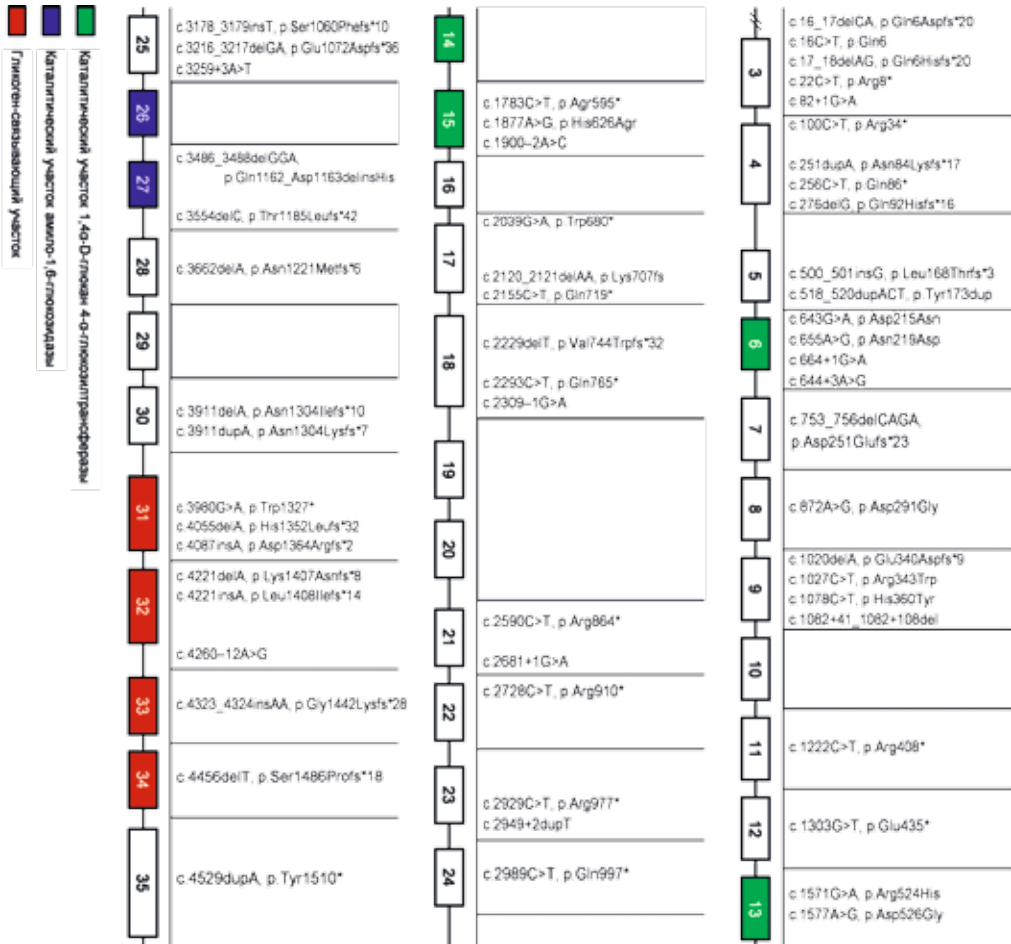


Рис. 47. Мутации гена *AGL*, объясняющие генотип-фенотипические корреляции. Адаптировано из публикации Sentner C.P. и соавт., 2016 [860]

ниями, содержащими сырой кукурузный крахмал, поддерживающий уровень глюкозы в крови на удовлетворительном уровне в течение 3–6 часов [308]. Предпочтительной формой лечения гипогликемии является быстрое внутривенное введение глюкозы, не вызывающее тошноту и рвоту, которые могут последовать от введения глюкагона. Для лечения острой гипогликемии используется внутривенный болюс 2,5 мл/кг 10%-го раствора декстрозы в стерильной воде. Внутривенное вливание глюкозы должно происходить со скоростью, которая соответствует нормальной эндогенной продукции глюкозы в печени. Этот показатель у детей раннего возраста составляет около 8–10 мг/кг/мин, тогда как



у детей старшего возраста составляет приблизительно 5–7 мг/кг/мин. Эти показатели являются ориентировочными; фактические показатели варьируются от пациента к пациенту. В случае, когда декстроза не может быть введена по тем или иным причинам, применяют глюкагон, повышающий уровень глюкозы в крови путем ингибирования синтеза гликогена и путем усиления образования глюкозы из неуглеводных источников, таких как белки и жиры, то есть глюконеогенеза. Пациенты с ГБ IIIa и IIId, находящиеся на конечной стадии цирроза печени или гепатоцеллюлярной карциномы, требуют хирургического вмешательства, которое иногда включает в себя пересадку печени. Трансплантация печени также с успехом используется у пациентов, резистентных к медикаментозной терапии [490].

Несмотря на то, что большинство пациентов с ГБ, тип III с возрастом демонстрируют улучшающуюся динамику, примерно у пятой части пациентов выявляются осложнения, что требует постоянного врачебного наблюдения [439] и раннего выявления мутаций, вызывающих болезнь, для постановки корректного диагноза.

1.3.1.3. Гликогеновая болезнь, тип IV. Болезнь Андерсена, амилопектиноз

Редкое моногенное наследственное заболевание, возникающее из-за мутаций гена *GBE1*, кодирующего гликоген-ветвящий фермент 1,4-глюкан: 1,4-глюкан-6-глюканотрансферазу, дефицит которого приводит к накоплению гликогена аномальной структуры в различных органах и тканях, преимущественно в печени и мышцах. Патогенные варианты гена *GBE1* наследуются по аутосомно-рецессивному типу. На эту форму ГБ приходится приблизительно 3% случаев от общего числа всех гликогеновых болезней накопления [224]. Усредненная частота ГБ, тип IV составляет 1 случай на 600 000–800 000 живых новорожденных [375].

В 1956 году американский педиатр и патологоанатом Дороти Андерсен впервые описала рассматриваемое состояние как семейный цирроз печени с накоплением аномального гликогена [89], исследуя когорту больных муковисцидозом. Через 10 лет Браун с коллегами определили, что причиной развития ГБ, тип IV является дефицит гликоген-ветвящего фермента [185].

В основе патогенеза ГБ, тип IV лежат патогенные варианты гена *GBE1*, расположенного в хромосомной области 3p12.3, состоящего из 16 экзонов и кодирующего гликоген-ветвящий фермент (GBE) α -1,4-глюкан: α -1,4-глюкан-6-гликозилтрансферазу, состоящую из 702 аминокислотных остатков и имеющую молекулярную массу 80,4 кДа

[940]. Этот белок играет существенную роль в биосинтезе гликогена, катализируя две реакции предположительно в пределах одного активного сайта. Сначала для каждых 10–14 гликозидных остатков линейной цепи гликоген-ветвящий фермент работает как амилаза, отщепляя не менее шести остатков глюкозы, соединенных α -1,4-гликозидными связями, с конца наружных растущих при помощи гликогенсинтазы (GYS) цепей, формируя таким образом α -1,6-гликозидные цепи. Во второй реакции гликоген-ветвящий фермент работает как глюканотрансфераза, перенося отщепленный олигосахарид и связывая его с помощью α -1,6-гликозидной связи с C6-гидроксильной группой остатка глюкозы той же самой цепи или соседней цепи (рис. 48) [346]. Специфичность фермента проявляется в том, что цепь из 6–8 гликозидных остатков, как правило, присоединяется к третьему по счету гликозидному остатку с невозстанавливающего конца этой же или соседней цепи. Благодаря такой специфичности в отношении количества гликозидных остатков в обеих цепях, фермент создает характерную структуру молекулы гликогена. До сих пор не удалось определить детерминанты специфичности этого фермента, такие как длина донорной цепи, длина акцепторной цепи, расстояние между двумя точками ветвления, относительная встречаемость переносов гликозидных остатков в рамках одной цепи по сравнению с переносами на соседние цепи [346].

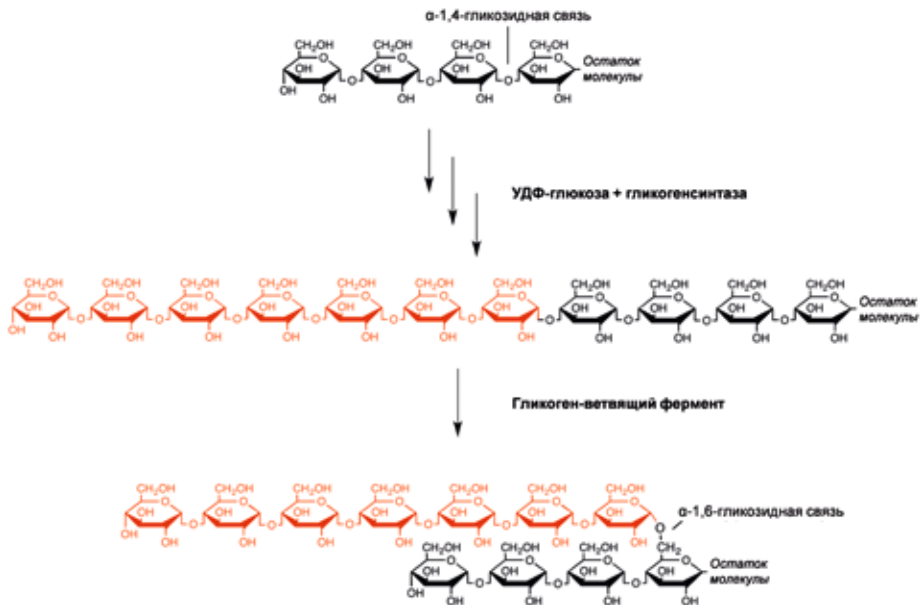


Рис. 48. Ветвление молекулы гликогена за счет катализирующего действия α -1,4-глюкан: α -1,4-глюкан-6-гликозилтрансферазы

В паре с гликогенсинтазой гликоген-ветвящий фермент формирует шаровидное и разветвленное строение гликогена, что повышает его растворимость путем создания гидрофильной поверхности и снижения осмотического давления внутри клетки [940], а также регулирует его синтез путем увеличения количества цепей, которые гликогенсинтаза удлинняет, опосредуя встраивание гликозидных остатков в конец этих цепей [657]. Подобный механизм действия ферментов также встречается в растениях; при этом в качестве субстрата для их работы используется амилопектин [723].

Сниженная активность α -1,4-глюкан: α -1,4-глюкан-6-гликозилтрансферазы приводит к образованию и накоплению амилопектиноподобного полисахарида, имеющего мало точек ветвления, чрезмерно длинные внешние цепи, обладающего плохой растворимостью и оказывающего токсическое действие на клетки, приводя к необратимому повреждению органы и ткани. Количество точек ветвления молекулы гликогена находится в прямой зависимости от активности ветвящего фермента. Чем ниже его активность, тем менее разветвленная структура полимера и длиннее его линейные внешние цепи [614].

Клинические проявления болезни Андерсена широко варьируют как среди больных членов одной семьи, так и среди представителей разных семей, охватывая континуум различных форм болезни в зависимости от времени манифестации и тяжести клинических признаков: фатальная перинатальная нервно-мышечная, классическая печеночная, непрогрессирующая печеночная, врожденная нервно-мышечная, детская нервно-мышечная, взрослая нервно-мышечная с изолированной миопатией [193]. Фатальная перинатальная нервно-мышечная форма ГБ, тип IV проявляется во время беременности в виде уменьшения подвижности плода, водянки плодного пузыря и водянки плода, тяжелой гипотонии, кардиомиопатии и артрогрипоза нижних конечностей (вследствие акинезии) при рождении, которое, как правило, наступает раньше положенного срока. Признаки цирроза или печеночной недостаточности отсутствуют. Смерть от этой формы ГБ, тип IV обычно наступает в неонатальном периоде [727, 794]. Младенцы с классической печеночной формой болезни Андерсена могут казаться нормальными при рождении, однако стремительное прогрессирование болезни проявляется в задержке роста и развития, гепатоспленомегалии, тяжелой гипотонии, кардиомиопатии и развитии цирроза печени в первые 18 месяцев жизни. Печеночная энцефалопатия может вызвать вялость, дезориентацию и даже кому. Болезнь может сопровождаться приступами кровавой рвоты из-за кровотечения вследствие варикозного расширения вен пищевода [613]. Без пересадки печени смерть от печеночной недостаточности обычно наступает в возрасте до пяти лет [684].

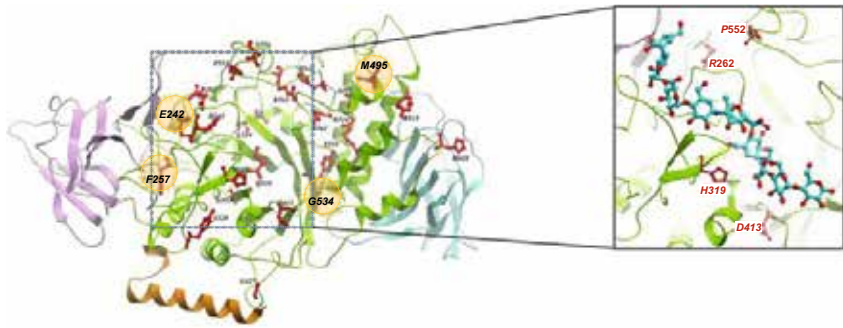


У пациентов, страдающих медленно прогрессирующей или непрогрессирующей формой заболевания, цирроз печени может протекать бессимптомно. У них обычно выявляется гепатоспленомегалия и незначительное повышение содержания трансаминаз в сыворотке крови. Обычно у таких детей не отмечаются нарушения роста и развития и даже концентрации печеночных ферментов с возрастом возвращаются к нормальным значениям. Врожденная нервно-мышечная форма ГБ, тип IV манифестирует в неонатальном периоде с глубокой гипотонии, респираторного дистресс-синдрома и дилатационной кардиомиопатии. Смерть обычно наступает в раннем младенческом возрасте [574]. Детская нервно-мышечная форма встречается редко и манифестирует в начале второй декады жизни с непереносимости физических нагрузок, обладая прогрессирующим течением, клинически проявляясь развитием хронической миопатии, а в некоторых случаях дилатационной кардиомиопатии и приводя к смерти в третьем десятилетии [797]. Взрослая нервно-мышечная форма болезни Андерсена представляет собой изолированную миопатию, носящую название полиглюкозановой болезни или болезни Лафоры. Симптомы заболевания могут напоминать таковые при мышечной дистрофии: слабость проксимальных отделов конечностей, прогрессирующее нарушение походки, трудности опорожнения (нейрогенный мочевой пузырь), периферическая нейропатия, судороги и мягкие когнитивные нарушения, приводящие к развитию деменции [677].

Характерная клиническая картина болезни Андерсена, а также проведение функциональной и лабораторной диагностики позволяют заподозрить и с однозначной уверенностью подтвердить диагноз. Функциональная диагностика, не являясь специфическим исследованием, включает в себя УЗИ брюшной полости, при помощи которого выявляется увеличение печени с признаками фиброза и цирроза, а также функциональные исследования сердца, при помощи которых выявляется кардиомиопатия и сердечная недостаточность. Гистологические исследования позволяют обнаружить амилопектиноподобные фибриллярные агрегаты, накапливаемые печенью и мышечной тканью, тогда как электронная микроскопия позволяет увидеть эти агрегаты в цитоплазме гепатоцитов. Кроме того, в эндоплазматическом ретикулуме значительно увеличенных гепатоцитов повсюду обнаруживаются инфильтраты пенистых гистиоцитов [613]. Специфические методы диагностики включают в себя измерение активности ветвящего фермента в культивированных фибробластах кожи, в биопсийном материале печени и мышечной ткани, а также молекулярно-генетическую диагностику, направленную на выявление биаллельных мутаций гена *GBE1*. К настоящему времени база HGMD содержит 64 патогенных

варианта гена *GBE1*. Большинство их разнообразия приходится на миссенс- и нонсенс-мутации 40 (62,5%), 9 описанных делеций и инсерций / дупликаций составляют 14,1%, на 8 сплайсинговых вариантов приходится 12,5%, протяженные делеции и комплексные перестройки составляют 10,9% [469]. Все эти мутации могут быть условно классифицированы на «дестабилизирующие» замены, нарушающие структуру кодируемого белка, и «каталитические» замены, расположенные проксимально по отношению к активным сайтам и оказывающие влияние на связывание олигосахарида. Чаще всего «дестабилизирующие» мутации разрушают водородные связи (*p.Q236H*, *p.E242Q*, *p.H243R*, *p.H319R/Y*, *p.D413H*, *p.H545R*, *p.N556Y*, *p.H628R*) (рис. 49б), реже – нарушают ионные взаимодействия (*p.R262C*, *p.R515C/H*, *p.R524Q*, *p.R565Q*), а также ароматические или гидрофобные взаимодействия (*p.F257L*, *p.Y329S/C*, *p.Y535C*, *p.P552L*) (рис. 49в). Кроме того, замены большого остатка на малый в структуре белка приводят к образованию полости (*p.M495T*, *p.Y329S/C*) (рис. 49г), в то время как замены небольшого остатка на большой создают стерические столкновения с соседними аминокислотными остатками (*p.G353A*, *A491Y*, *p.G534V*; рис. 49д). «Каталитические» мутации, возникающие в положениях *Arg262*, *His319*, *Asp413* и *Pro552*, могут выравнять доступ олигосахаридов к активным сайтам (рис. 49а). В частности, замещение остатка *His319*, ориентированного на активный сайт, заряженным аргинином (*p.H319R*) или громоздким тирозином (*p.H319Y*), может потенциально дестабилизировать олигосахарид (рис. 49).

Тяжесть мутации, наглядно определяемая ее классом, выражается в ферментативной активности экспрессируемого фермента и, как следствие, в тяжести клинической картины болезни, являясь наилучшим предиктором исхода заболевания для конкретного больного. Среди генотип-фенотипических корреляций наилучшим образом описана связь мутаций *p.Tyr329Ser*, *p.Arg515His* и *p.Arg524Gln* с развитием полиглюкозановой болезни [534, 1060]. Мутация *p.Tyr329Ser* была также описана у больных непрогрессирующей печеночной формой болезни Андерсена, мутация *p.Arg524Gln* ассоциирована с непрогрессирующей печеночной формой болезни и классической печеночной формой болезни, большинство нонсенс-мутаций, мутаций, приводящих к нарушению сплайсинга, а также протяженных делеций было описано у больных фатальной перинатальной нервно-мышечной формой и врожденной нервно-мышечной формой ГБ, тип IV [552, 561]. Больные с классической печеночной формой болезни, как правило, являются компаунд-гетерозиготами, одна из которых сплайсинговая или нонсенс-мутация, вторая – миссенс-мутация [105, 188, 574, 613]. Патогенные варианты гена *GBE1*, выявленные в ходе молекулярно-генетической диагностики пробанда, позволяют прово-

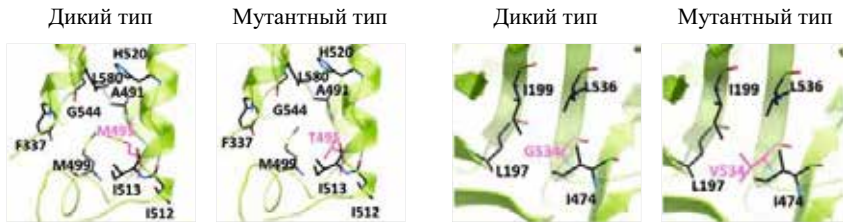


a



б

в



г

д

Рис. 49. Структурный анализ мутаций гена *GBE1*: а – картирование миссенс-мутаций, связанных с развитием заболевания; б – нарушение водородных связей (*p.E242Q*); в – заполнение полости гидрофильного аминокислотного остатка гидрофобным (*p.F257A*); г – нарушение гидрофобных взаимодействий (*p.M495T*); д – нарушение пространственной структуры радикалов (*p.G534V*). Адаптировано из публикации Froese D.S. и соавт., 2015 [346].

дить медико-генетическое консультирование, определяя носительство мутаций sibсами и другими членами отягощенных семей, а также пренатальную и преимплантационную диагностику. Пренатальная диагностика может осуществляться и с помощью биохимического исследования активности ветвящего фермента в культивируемых амниоцитах и ворсинках хориона.

Лечение пациентов с ГБ, тип IV должно осуществляться многопрофильной командой специалистов, включая гепатологов, неврологов, кардиологов, диетологов и других врачей. Трансплантация печени является единственным вариантом лечения печеночной недостаточности, неизбежно развивающейся у пациентов с классической печеночной формой болезни Андерсена [222]. В рамках исследования, проведенного Дэвисом и Вайнштайном, из 18 пациентов с пересаженной печенью двоим потребовалась повторная пересадка печени и шестеро умерли: четверо от сепсиса, один от тромбоза печеночной артерии и один от кардиомиопатии [277]. Такой неутешительный прогноз для пациентов с ГБ, тип IV, перенесших трансплантацию печени, является неудовлетворительным из-за значительного риска осложнений, частично относящихся к внепеченочным проявлениям ГБ, тип IV, особенно кардиомиопатии [1022]. Уровень активности ветвящего фермента, варьирующий в различных органах, может корректировать лечение, являясь предиктором различных осложнений болезни Андерсена, коррелируя с формой болезни и ее тяжестью. Больные, у которых развивается кардиомиопатия, могут быть кандидатами для трансплантации сердца [321]. Однако рассмотрение потенциальных противопоказаний к трансплантации сердца, в том числе миопатия, печеночная недостаточность и кахексия, имеют важное значение для выбора этого варианта лечения. Детям со скелетной миопатией и/или гипотонией, испытывающим задержку развития, назначают физическую терапию по мере необходимости. Дефицит питательных веществ, например жирорастворимых витаминов, помогает обеспечить адекватное диетическое лечение. Тщательное соблюдение диетического режима способствует уменьшению размера печени, предотвращает гипогликемию, препятствует замедлению роста и развития. Появляется все больше свидетельств того, что диета с высоким содержанием белка может обеспечить повышенную функцию мышц у пациентов с миопатией или непереносимостью физической нагрузки, а также замедлить прогрессирование заболевания [689]. В силу склонности больных ГБ, тип IV к кровотечениям рекомендуется оценивать профиль коагуляции до проведения хирургических процедур.

Научные исследования свидетельствуют о том, что корректирующая генная терапия может быть применена для лечения гликогеновых болезней [1062], тогда как опыт ферментозаместительной терапии для БП позволяет надеяться на разработку и внедрение соответствующих препаратов и для других ГБ, в том числе и болезни Андерсена. Успех подобных разработок напрямую зависит от информации о частоте и спектре мутаций в различных популяциях, а раннее их выявление позволяет поставить правильный диагноз и скорректировать соответствующую терапию.

1.3.1.4. Гликогеновая болезнь, тип VI. Болезнь Герса

Редкое наследственное заболевание, развивающееся вследствие биаллельных мутаций гена *PYGL*, кодирующего печеночную фосфоорилазу, сниженная активность которой приводит к накоплению гликогена клетками печени. Считается, что ГБ, тип VI встречается редко и ее частоту обычно оценивают в мировой литературе совместно с ГБ, тип IX, приравнивая к 1 случаю на 65 000–85 000 живых новорожденных, при этом отмечая, что подавляющее большинство случаев приходится на ГБ, тип IX [91]. Достоверно известно, что чаще всего ГБ, тип VI встречается в популяции меннонитов, составляя 1 случай на 1000 живых новорожденных благодаря так называемому эффекту основателя [220]. Мутации гена *PYGL* наследуются по аутосомно-рецессивному типу.

В 1959 году бельгийский физиолог и биохимик Генри Герс впервые охарактеризовал ГБ, тип VI на основе ферментативных исследований фрагментов печени [434], что способствовало позднее закреплению за этим заболеванием имени этого ученого. А в 80-е годы прошлого века удалось обнаружить и описать все 3 изоформы гликогенфосфоорилазы с местами их преобладающей экспрессии и генами, которые их кодируют [275, 716]. Однако в настоящее время под болезнью Герса все чаще подразумевается фенотип, объединяющий ГБ, тип VI и ГБ, тип IX, которые имеют незначительные клинические различия, но вызываются мутациями в разных генах.

В основе патогенеза ГБ, тип VI лежат мутации гена *PYGL*, расположенного в хромосомной области 14q22.1, состоящего из 20 экзонов и кодирующего гликогенфосфоорилазу печени, состоящую из 845 аминокислотных остатков с молекулярной массой 97,4 кДа [406]. Гликогенфосфоорилаза, активированная посредством киназы фосфоорилазы b, катализирует расщепление α -1,4-гликозидных связей в линейных цепях молекулы гликогена с высвобождением терминальных фосфорилированных глюкозных остатков (глюкозо-1-фосфатов), регулируя, наряду с девятью ферментами, скорость гликогенолиза у животных (рис. 50).

Деятельность гликогенфосфоорилазы печени управляется глюкагоном и инсулином, которые активируют либо ингибируют киназу фосфоорилазы, а также посредством различных аллостерических лигандов, таких как АТФ и АМФ, обеспечивая внутриклеточные потребности в глюкозе. Сниженная активность гликогенфосфоорилазы печени приводит к постепенному накоплению гликогена гепатоцитами и снижению уровня глюкозы в крови. Две другие изоформы фосфоорилазы, экспрессирующиеся в мышцах и мозге, кодируются генами *PYGM* и *PYGB* соответственно. Существование изоформ с различными регулирующими свойствами, вероятно, отражает различные функциональные

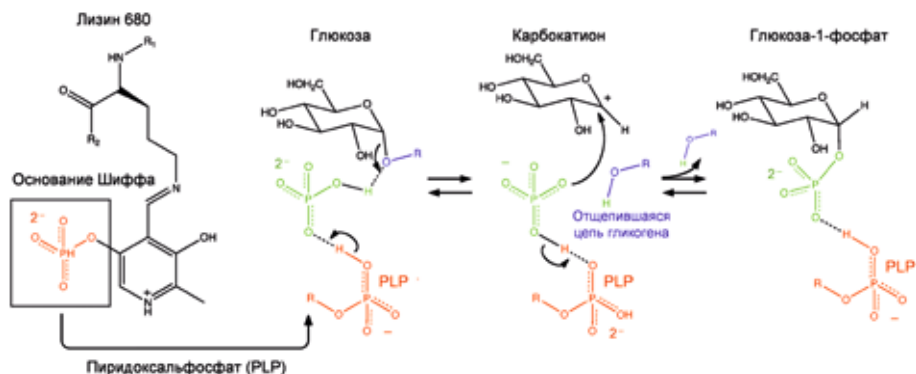


Рис. 50. Механизм обратимого фосфорилирования

Примечание. В каждом каталитическом сайте гликогенфосфорилазы есть молекула пиридоксальфосфата (ПФ, полученный из витамина В). ПФ ковалентно связывается с аминокислотными остатками (в данном случае Lys680) и образует основание Шиффа. После образования базовой связи Шиффа с молекулой ПФ в активном центре фосфатная группа на ПФ легко жертвует протон неорганической молекулы фосфата, позволяя неорганическому фосфату, в свою очередь, депротонирование кислородом с образованием α-1,4-гликозидной связи. ПФ легко депротонируется, потому что его отрицательный заряд стабилизировался не только в фосфатной группе, но и в пиридиновом кольце, таким образом, сопряженное основание также стабилизировалось в результате депротонирования ПФ. Молекула глюкозы с вторичным карбокатионом в первом положении отделяется от гликогеновой цепи с протонированным кислородом, которая, в свою очередь, укорачивается на одну молекулу глюкозы. И, наконец, депротонированный неорганический фосфат действует в качестве нуклеофильного агента, взаимодействуя с карбокатионом, что приводит к образованию глюкозо-1-фосфата. Хотя реакция является обратимой в растворе, в клетке фермент работает только в прямом направлении, так как концентрация неорганического фосфата значительно выше, чем глюкозо-1-фосфата [594].

роли и способы регуляции метаболизма гликогена в различных типах клеток [267].

Клиническая картина болезни Герса, как правило, манифестирует в младенческом и раннем детском возрасте в виде заметной гепатомегалии и задержки роста. Мягкая гипогликемия может проявляться во время болезни и после длительного голодания, тогда как кетонная гипогликемия может проявляться после ночного голодания, являясь характерной чертой этого расстройства; биохимические лабораторные показатели демонстрируют гиперлипидемию, при этом показатели мочевой и молочной кислоты, как правило, не выходят за пределы референсных величин [1029]. Уровень глюкозы в крови не поднимается в ответ на действие глюкагона. Интеллектуальное развитие большинства больных детей является нормальным. Считается, что сердце и ске-



летные мышцы в этом типе гликогеноза не поражаются, гиперурикемия не развивается, а гепатомегалия уменьшается с возрастом и зачастую исчезает в период полового созревания, наравне с большинством других клинических и биохимических аномалий, однако существуют единичные описания пациентов с мягкой кардиомиопатией и фиброзом печени [812]. При этом описаны случаи тяжелого течения ГБ, тип VI с тяжелой и рецидивирующей гипогликемией, тяжелой гепатомегалией, постпрандиальным лактатацидозом, с мышечной гипотонией и усталостью после физических упражнений [126]. В редких случаях ГБ, тип VI сопровождается развитием гепатоцеллюлярной аденомы печени [623].

В связи с тем, что дефицит гликогенфосфорилазы печени трудно диагностировать биохимически, так как его трудно отличить от дефицита активирующего фермента, киназы фосфорилазы b, встречающегося гораздо чаще, молекулярно-генетические исследования являются универсальным методом лабораторной диагностики недостатков системы фосфорилирования печени. Сложность измерений активности гликогенфосфорилазы печени кроется и в ее зависимости от многих факторов, таких как различные аллостерические, нервные и гуморальные сигналы, которые могут оказывать непосредственное влияние на ферментативную активность, что также может дать ложный результат диагностики, даже в исследованиях, проводимых в ткани печени. Молекулярно-генетическое исследование, осуществляемое методом двунаправленного секвенирования по Сэнгеру, позволяет выявить около 100% описанных мутаций в гене *PYGL*. К настоящему времени база HGMD содержит 38 патогенных вариантов гена *PYGL*. Большинство их разнообразия приходится на миссенс- и нонсенс-мутации (25 (65,8%)), 5 обнаруженных делеций и инсерций / дупликаций составляют 13,2%, 8 сплайсинговых вариантов – 21% [477]. Самой частой мутацией в популяции меннонитов считается мутация *c.1620+1G>A*, приводящая к нарушению сплайсинга [220]. Четкие фенотипические корреляции для этой болезни не описаны. В связи с неразличимостью клинической картины ГБ, тип VI и ГБ, тип IX, женщинам с подозрением на эту болезнь в первую очередь проводят диагностику гена *PYGL*, из-за X-сцепленного наследования наиболее частой формы ГБ, тип IXa. Для ГБ, тип VI, как и для подавляющего большинства наследственных болезней, единственным профилактическим средством может являться молекулярно-генетическое обследование родственников пробанда на предмет носительства патогенных вариантов гена и консультация врача-генетика, помогающего свести к минимуму риск повторного рождения больного ребенка в отягощенной семье с помощью информирования о соответствующих рисках, а также благодаря проведению пренатальной и преимплантационной диагностики.

Лечение этого типа ГБ симптоматическое. Некоторым больным детям с небольшим снижением ферментативной активности не требуется никакого лечения, тогда как большинство больных детей демонстрируют заметное улучшение на фоне терапии. Развитие гепатомегалии и гипогликемии может быть предотвращено путем введения сырого кукурузного крахмала (1,5–2г/кг) от одного до трех раз в день в зависимости от тяжести болезни. Те же дозы сырого кукурузного крахмала способствуют нормализации концентрации глюкозы в крови и помогают избежать кетоза [696]. Остеопороз, низкий рост и задержка полового созревания, связанные с хроническим кетозом, являются общим проявлением ГБ, тип VI для нелеченных больных, которым строго рекомендована диета, насыщенная сложными углеводами или кукурузным крахмалом, способствующая улучшению плотности костной ткани [812]. В связи с серьезными последствиями развития кетоза, уровень кетонов в крови важно измерять несколько раз в месяц с целью поддержания концентрации бета-ОН-бутирата в крови ниже 0,3 ммоль/л [270]. Исследование, проведенное Асами и коллегами, позволяет рассчитывать на то, что при помощи клонидина можно осуществлять успешное лечение пациентов с ГБ, тип VI [103].

1.3.1.5. Болезнь накопления гликогена, тип IX. Болезнь Хага

Группа моногенных наследственных болезней, характеризующихся нарушением обмена веществ, возникающих вследствие патогенного изменения нуклеотидной последовательности генов, кодирующих различные субъединицы киназы фосфорилазы b, дефицит которой может приводить к накоплению гликогена в печени и мышечной ткани. Частота ГБ, тип IX оценивается как 1 случай на 100 000 живых новорожденных, составляя 25% всех случаев ГБ [615]. Киназа фосфорилазы b, впервые описанная Фишером и Кребсом в 50-е годы прошлого века, относится к классу серин / треонин-зависимых протеинкиназ и активируется протеинкиназой A [336, 547]. Функция киназы фосфорилазы b состоит в активации гликогенфосфорилазы и стабилизации ее активной конформации, при этом детали этого механизма продолжают изучаться и в наше время из-за сложной организации самого белка [498]. Киназа фосфорилазы b представляет собой большой тетрамер молекулярной массой 1,3 МДа, каждая из четырех единиц которого состоит из четырех субъединиц, названных четырьмя первыми буквами греческого алфавита: альфа, бета, гамма и дельта, и кодируемых генами: *PHKA1/PHKA2*, *PHKB*, *PHKG1/PHKG2* и *CALM1/CALM2/CALM3* соответственно. Биаллельные мутации в трех первых генах приводят к кли-



ническим проявлениям ГБ, тип IXd/a (OMIM 300559/306000); ГБ, тип IXb (OMIM 261750); ГБ, тип IXc (OMIM 613027), тогда как мутации в гене *CALM1/CALM2* вызывают лонг-QT-синдром, тип 14/15 (OMIM 616247). Тип передачи ГБ, тип IXa и ГБ, тип IXd носит X-сцепленный характер, тогда как ГБ, тип IXb и ГБ, тип IXc наследуются в соответствии с аутосомно-рецессивным типом.

Активность киназы фосфоорилазы b особенно важна в печени и мышечной ткани. В то время как распад гликогена в клетках мышечной ткани отвечает за незамедлительную активность мышц, клетки печени отвечают за поддержание концентрации глюкозы в крови, что регулируется активностью различных субъединиц киназы фосфоорилазы b [135]. Функционирование киназы фосфоорилазы b, в свою очередь, регулируется как аллостерически, так и с помощью обратимого фосфоилирования. Гормоны, нервные импульсы и сокращения мышц стимулируют высвобождение ионов кальция, которые аллостерическим путем связываются с дельта-субъединицей киназы фосфоорилазы b, частично активируя белок и стабилизируя его в активной форме. Полная активация фермента наступает при дальнейшем фосфоилировании альфа- и бета-субъединиц киназы фосфоорилазы b протеинкиназой A [189]. В мышечных клетках фосфоилирование регуляторных альфа- и бета-субъединиц киназы фосфоорилазы b является результатом цАМФ-опосредованного клеточного сигнального каскада, который, в свою очередь, инициируется связыванием эпинефрина с бета-адренергическими рецепторами на поверхности клетки. При этом высвобождение ионов кальция из саркоплазматического ретикулума во время сокращения мышц активирует дельта-субъединицу. В клетках печени глюкагон и эпинефрин могут запустить каскад цАМФ, при этом эпинефрин связывается с альфа-адренергическим рецептором, чтобы вызвать высвобождение ионов кальция из эндоплазматического ретикулума. Каталитическая субъединица гамма обладает постоянной активностью благодаря наличию отрицательно заряженного остатка глутамата и не требует фосфоилирования остатков серина или тирозина для собственной активации [601]. При прекращении распада гликогена в клетке, альфа- и бета-субъединицы киназы фосфоорилазы b дефосфоилируются под действием фосфатазы 1 или 2 (рис. 51) [487].

ГБ, тип IX впервые был описан в медицинской литературе в 1966 году доктором Хагом, который обнаружил случай дефицита киназы фосфоорилазы b печени у молодой девушки и установил аутосомно-рецессивный тип наследования [457]. Позже в медицинской литературе были описаны похожие клинические случаи, однако тип наследования был сцеплен с полом. Эти больные были первоначально классифицированы как пациенты с ГБ, тип VIII, однако позднее их отнесли к девя-

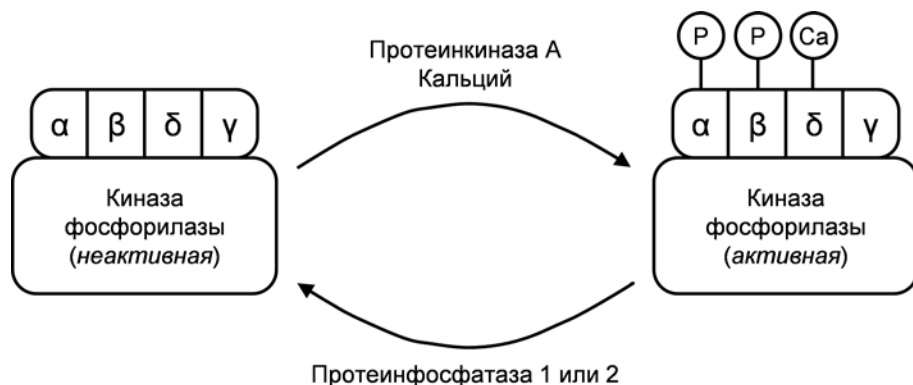


Рис. 51. Обратимая активация киназы фосфорилазы ν . Адаптировано из публикации Ingebritsen T.S. и соавт., 2016 [487]

тому типу в связи с дефицитом того же фермента, что и у пациентов с аутосомно-рецессивной формой наследования.

ГБ, тип IXa является наиболее распространенным подтипом ГБ, тип IX. На него приходится примерно 75% всех случаев ГБ, тип IX [951]. Он подразделяется на два подтипа: ГБ, тип IXa1, характеризующийся дефицитом фермента в печени и эритроцитах, и ГБ, тип IXa2, характеризующийся сниженной активностью фермента в печени и нормальной активностью фермента в эритроцитах. Ген *PNKA2*, расположенный в хромосомной области Xp22, охватывает 91,3 т.п.н. и содержит 33 экзона, кодируя альфа-субъединицу печеночной киназы фосфорилазы ν , состоящую из 1235 аминокислотных остатков и экспрессирующуюся в клетках печени и головном мозге и не экспрессирующуюся в мышечной ткани [428]. К настоящему времени в базе HGMD описано 100 различных патогенных вариантов в гене *PNKA2*, 62 (62%) из которых являются миссенс- и нонсенс-мутациями, 29 (29%) – небольшими делециями и инсерциями/дупликациями, 6 (6%) описанных мутаций относятся к сплайсинговым и 9 (9%) являются протяженными делециями [474]. Патогенные варианты равномерно распределены по всему гену. *PNKA2* высоко гомологичен *PNKA1* и *PNKB* [395].

ГБ, тип IXb возникает и развивается из-за мутаций гена *PNKB*, длиной 140 т.п.н., расположенного в хромосомной области 16q12, состоящего из 33 экзонов и кодирующего бета-субъединицу киназы фосфорилазы ν , состоящую из 1092 аминокислотных остатков и экспрессируемую как в печени, так и в мышечной ткани [1038]. К настоящему времени в базе HGMD описано 22 патогенных варианта гена *PNKB*, 10 (45,5%) из которых миссенс- и нонсенс-мутации, 7 (31,8%) мутаций сайтов сплайсинга, 4 (18,2%) небольших делеции и инсерции / дупликации,

одна (4,5%) протяженная делеция [475]. Два изменения референсной последовательности *c.555G>T* (*p.Met185Ile*) и *c.1969C>A* (*p.Gln657Lys*) были выявлены в гетерозиготном состоянии, что не позволяет считать их патогенность достоверной [126]. Неизвестно, как именно патогенные варианты *PHKB* приводят к дефициту киназы фосфорилазы b, однако очевидно, что ухудшается регуляторная функция бета-субъединицы фермента и ее взаимодействие с другими субъединицами белка. Биохимические данные свидетельствуют о том, что альфа-гамма-дельта-комплекс может функционировать в отсутствие бета-субъединицы, объясняя остаточную ферментативную активность, наблюдаемую у некоторых пациентов с мягкими клиническими признаками [194].

ГБ, тип IXc характеризуется дефицитом фермента в печени, так как ген *PHKG2*, расположенный в хромосомной области 16p11, длиной 9,5 т.п.н., состоит из 10 экзонов и кодирует печеночную изоформу гамма-субъединицы киназы фосфорилазы b, состоящую из 406 аминокислотных остатков [195]. К настоящему времени в международной базе данных HGMD числится 31 патогенный вариант гена *PHKG2*, включая 21 (67,7%) миссенс/нонсенс вариант, 6 (19,4%) небольших делеций и инсерций / дупликаций и 4 (12,9%) мутации сайтов сплайсинга [476]. Патогенные варианты *PHKG2* воздействуют на каталитическую способность синтезируемой гамма-субъединицы, воздействуя тем самым на стабильность или конформацию всего белка [395].

ГБ, тип IXd развивается вследствие мутаций гена *PHKA1*, расположенного в хромосомной области Xq13, длиной 133 т.п.н., состоит из 32 экзонов и кодирует мышечную изоформу альфа-субъединицы киназы фосфорилазы b, состоящую из 1223 аминокислотных остатков, молекулярной массой 138 кДа [1049]. На сегодняшний день база HGMD содержит всего лишь 7 патогенных вариантов, описанных в гене *PHKA1*, каждый из которых был обнаружен в единичном случае [473]. На основании этих данных можно предположить, что этот подтип является наиболее редким среди гликогенозов девятого типа. Патогенные варианты включают 3 миссенс-варианта, 3 небольшие делеции и одну мутацию сайта сплайсинга [196, 739, 775]. Были идентифицированы два варианта альтернативного сплайсинга, кодирующие различные изоформы экспрессируемого белка: альфа-FM в преобладающей степени экспрессируется в быстро сокращающихся скелетных мышцах и в головном мозге, в то время как альфа-RM по большей части экспрессируется в медленно сокращающихся скелетных мышцах. Альфа-RM имеет внутреннюю делецию пятидесяти девяти аминокислот (с 654 по 712), по сравнению с альфа-FM. Степень фосфорилирования альфа-субъединицы напрямую регулирует активность киназы фосфорилазы b: чем больше фосфорилирование, тем меньше ингибирующее действие фермента. Не было про-

ведено ни одного исследования для определения механизмов возникновения дефицита киназы фосфорилазы *b* при выявленных патогенных вариантах *PHKA1*. Предполагается, что полное отсутствие белка *PHKA1* может влиять как на образование, так и на стабильность киназы фосфорилазы *b*, тогда как синтез измененного в результате миссенс-мутаций белка *PHKA1* может привести к его неспособности взаимодействовать с другими субъединицами для активации фермента [395].

В настоящей работе была поставлена задача оптимизации алгоритма генетической диагностики ГБ различных типов посредством технологии высокопроизводительного секвенирования с клинико-географическим и генотип-фенотипическим описанием российских детей с подтвержденным нами диагнозом.

1.3.1.6. Изучение молекулярных основ гликогеновых болезней с преимущественным поражением печени у российских пациентов

Постановка диагноза требует биохимического исследования биопсийного материала печени, либо мышцы, что в большинстве случаев не представляется возможным, тогда как проведение молекулярно-генетической диагностики стоит дорого и занимает много времени ввиду значительной генетической гетерогенности ГБ. Все это в лучшем случае приводит к несвоевременному оказанию медицинской помощи больным детям, а в худшем – к 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.

1.3.1.6.1. Селективный скрининг гликогеновых болезней

В 2015 году нами был разработан метод мультиплексной молекулярно-генетической диагностики всех 16 типов ГБ, упомянутых к настоящему 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 массового параллельного секвенирования. Проведенное исследование помогло поставить точный клинический диагноз 100 (91,7%) детям из 109 пациентов с подозрением на ГБ. Биоматериал пациентов с подозрением на ГБ II типа для ферментативного и молекулярно-генетического исследования



направлялся в нашу лабораторию в рамках другого селективного скрининга, что описано в п. 1.3.2. В результате упомянутого 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.

1.3.1.6.2. Клинические, географические и генетические особенности гликогеновых болезней

Возрастные характеристики появления первых клинических признаков и постановки диагноза удалось определить у 89 (70,1%) пациентов с установленным диагнозом. Средний возраст манифестации клинических симптомов составил 1 год и 2 месяца, медиана – 8 месяцев. Средний возраст постановки диагноза составил 2 года и 8 месяцев, медиана – 1 год и 9 месяцев. Наименьшим возрастом дебюта болезни и возрастом постановки диагноза отличались пациенты с ГБ I типа, наибольшим – с поздней формой ГБ II типа.

Географические особенности ГБ были установлены для 92 (72,4%) обследованных пациентов (табл. 39).

Таблица 39. Распределение обследованных нами пациентов с ГБ в различных субъектах РФ

Субъект	Численность населения	Число семей	Число случаев	Частота в субъекте*
Москва	12 615 882	10	11	1:1 146 898
Свердловская область	4 315 702	9	9	1:479 522
Республика Башкортостан	4 051 005	5	5	1:810 201
Белгородская область	1 547 418	5	5	1:309 484
Красноярский край	2 874 050	4	4	1:718 513
Московская область	7 599 756	4	4	1:1 899 939
Ставропольский край	2 795 103	4	4	1:698 776
Челябинская область	3 475 727	4	4	1:868 932
Республика Дагестан	3 085 738	3	3	1:1 028 579
Республика Татарстан	3 898 700	3	3	1:1 299 567
Приморский край	1 902 719	2	3	1:634 240
Брянская область	1 200 228	2	2	1:600 114
Вологодская область	1 167 719	2	2	1:583 860

Продолжение таблицы 39

Субъект	Численность населения	Число семей	Число случаев	Частота в субъекте*
Кировская область	1 272 133	2	2	1:636 067
Новосибирская область	2 793 389	2	2	1:1 396 695
Пермский край	2 610 800	2	2	1:1 305 400
Самарская область	3 183 038	2	2	1:1 591 519
Сахалинская область	489 638	2	2	1:244 819
Санкт-Петербург	5 383 968	2	2	1:2 691 984
Республика Адыгея	454 762	1	2	1:227 381
Астраханская область	1 014 065	1	2	1:507 033
Амурская область	793 194	1	1	1:793 194
Архангельская область	1 144 119	1	1	1:1 144 119
Волгоградская область	2 507 488	1	1	1:2 507 488
Воронежская область	2 327 843	1	1	1:2 327 843
Забайкальский край	1 065 785	1	1	1:1 065 785
Республика Ингушетия	497 393	1	1	1:497 393
Кабардино-Балкарская Республика	866 310	1	1	1:866 310
Калининградская область	1 012 253	1	1	1:1 012 253
Камчатский край	314 722	1	1	1:314 722
Республика Коми	830 235	1	1	1:830 235
Костромская область	637 296	1	1	1:637 296
Республика Крым и Севастополь	2 355 027	1	1	1:2 355 027
Омская область	1 944 225	1	1	1:1 944 225
Оренбургская область	1 963 007	1	1	1:1 963 007
Ростовская область	4 202 337	1	1	1:4 202 337
Саратовская область	2 440 729	1	1	1:2 440 729
Тверская область	1 269 650	1	1	1:1 269 650
Тульская область	1 478 814	1	1	1:1 478 814
Тюменская область	3 723 984	1	1	1:3 723 984
Удмуртская Республика	1 507 390	1	1	1:1 507 390
Ульяновская область	1 238 424	1	1	1:1 238 424
Республика Хакасия	536 167	1	1	1:536167
Чеченская Республика	1 456 951	1	1	1:1 456 951
Чувашская Республика	1 223 395	1	1	1:1 223 395

Продолжение таблицы 39

Субъект	Численность населения	Число семей	Число случаев	Частота в субъекте*
Республика Саха (Якутия)	966 997	1	1	1:966 997
Ханты-Мансийский АО	1 663 798	1	1	1:1 663 798
Ямало-Ненецкий АО	541 479	1	1	1:541 479

Примечание. *На основе выборки пациентов, обследованных в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

Все выявленные случаи ГБ, для которых были установлены географические особенности, распределились по 48 (55,8%) субъектам РФ с преобладанием в Москве (11/10,8%), Свердловской области (9/8,8%), Республике Башкортостан (5/4,9%), Белгородской области (5/4,9%), а также Московской и Челябинской областях, Красноярском и Ставропольском краях (по 4/3,9%). Значительный процент выявляемых случаев в этих восьми субъектах РФ может указывать на высокую численность населения, при этом пять случаев ГБ выявлено среди неродственных детей в Белгородской области, не отличающейся значительной численностью населения.

На уровне федеральных округов распределение описанных случаев детей с ГБ демонстрирует преобладание в Центральном федеральном округе (26/25,5%), Приволжском федеральном округе (19/18,6%) и Уральском федеральном округе (16/15,7%). В каждом из остальных федеральных округов проживают менее 10% пациентов с ГБ из числа обследованных нами (табл. 40).

Таблица 40. Распределение обследованных пациентов с ГБ в различных федеральных округах РФ

Федеральный округ	Численность населения	Число семей	Число пациентов	Частота в округе*
Центральный	39 378 947	25	26	1:1 514 575
Приволжский	29 397 227	19	19	1:1 547 222
Уральский	12 350 131	16	16	1:771 883
Северо-Кавказский	9 866 370	10	10	1:986 637
Дальневосточный	8 188 594	8	9	1:909 844
Сибирский	17 173 185	8	8	1:2 146 648
Северо-Западный	13 972 061	7	7	1:1 996 009
Южный	16 454 580	5	7	1:2 350 654

Примечание. *На основе выборки пациентов, обследованных в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

Молекулярно-генетическое исследование и последующая постановка клинического диагноза позволили впервые описать частоту различных типов ГБ у детей в РФ [52] (рис. 52).

Из рис. 52 очевидно, что наиболее распространенной формой ГБ, обнаруженной у 44 (34,7%) обследованных детей, является ГБ, тип IX. ГБ, тип II была обнаружена у 27 (21,3%) обследованных пациентов, ГБ, тип I – у 25 (19,7%) обследованных детей, тогда как ГБ, тип III – у 23 (18,1%). Остальные типы ГБ были обнаружены с долями менее 10% (см. рис. 52). При этом необходимо принимать во внимание, что случаи ГБ, тип II были обнаружены в результате селективного скрининга 2978 пациентов, в том числе взрослых с подозрением на БП, что, очевидно, способствует завышению итоговой частоты выявленных случаев относительно других типов ГБ.

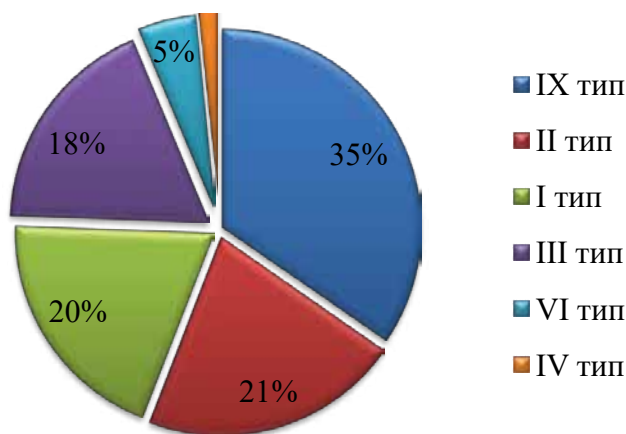


Рис. 52. Относительные частоты различных типов ГБ у обследованных российских пациентов

До последнего времени в мировой литературе отсутствовали описания мультиплексной молекулярно-генетической диагностики всех типов ГБ у детей. Существует лишь два исследования небольших когорт 24 и 47 пациентов различных возрастных групп с подозрением на ГБ, в которых были получены схожие данные, описывающие преимущественную встречаемость ГБ I, III и IX типов [984, 1001].

Анализ генетических особенностей развития заболевания позволил описать распределение 117 различных вариантов в девяти генах у 127 детей с ГБ (рис. 53). Необходимо отметить, что редкие, а также новые варианты были обнаружены и в других генах, однако анализ клинической картины болезни не позволил считать эти варианты этиологическими причинами развития болезни.

Чаще других встречались патогенные варианты гена *PHKA2*, мутации которого вызвали ГБ, тип IXa у 34 (26,8%) пациентов (см. рис. 53). Среди 23 (19,7%) различных выявленных вариантов 15 (65,2%) оказались не описанными ранее в базе данных HGMD. Это один патогенный и шесть вероятно патогенных миссенс-вариантов: *c.92G>A, p.G31* (PS2, PM2, PP3, PP4); *c.755C>T, p.S252F* (PS2, PM2, PP3, PP4); *c.772G>A, p.G258R* (PS2, PM2, PP3, PP4); *c.897T>G, D299E* (PM1, PM2, PM5, PP3, PP4); *c.2578C>T, p.R860W* (PS2, PM2, PP3, PP4); *c.3295T>C, p.S1099P* (PM1, PM2, PP3, PP4) и *c.3613C>A, p.P1205T* (PS2, PM2, PM5, PP3, PP4); три патогенных нонсенс-мутации: *c.903T>G, p.W301** (PVS1, PM2, PP4); *c.3277C>T, p.Q1093** (PVS1, PM2, PP4); *c.3016G>T, p.E1006** (PVS1, PM2, PP4); одна патогенная делеция *c.1294_1295del, p.T432Ffs*5* (PVS1, PM2, PP4); две патогенные и одна вероятно патогенная дупликации: *c.3235_3238dup, p.V1080Efs*39* (PVS1, PM2, PP4); *c.3348_3371dup, p.I1118_E1125dup* (PM1, PM2, PM4, PP4); *c.3570dup, p.D1191Rfs*12* (PVS1, PM2, PP4) и один патогенный вариант, затрагивающий канонический сайт сплайсинга: *c.919-2A>G* (PVS1, PM2, PP4).

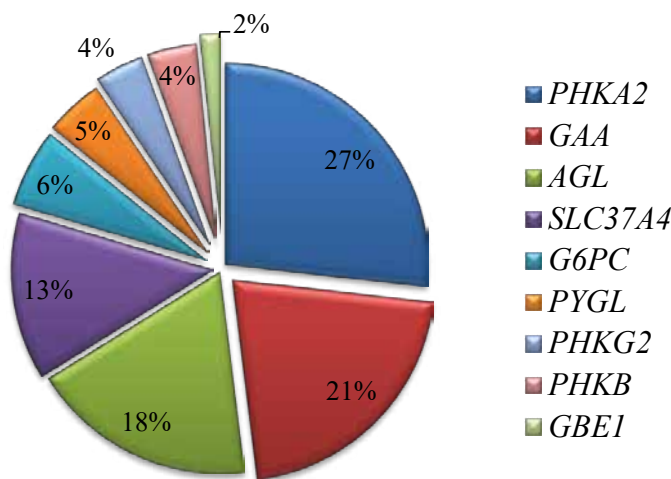


Рис. 53. Относительные частоты и спектр генов, содержащих мутации, у 127 российских детей с ГБ

При этом мутация *c.884G>A, p.R295H* встретилась у 5 (14,7%) пациентов из Москвы, Московской области, Краснодарского края и Ставропольского края, двое из которых были родными братьями. Эта мутация, впервые описанная Хедриксом и коллегами у двух пациентов из США и Великобритании [428], была недавно описана среди китайцев с ГБ, тип IXa с популяционной частотой 17% [1052],

что сравнимо с относительной частотой этой мутации, полученной в ходе нашего исследования. Мутация *c.3614C>T*, *p.P1205L* встретилась у 4 (11,8%) пациентов из Санкт-Петербурга, Волгоградской области, Пермского и Приморского края. Эта мутация, впервые описанная у датского пациента с ГБ, тип IXa [960], а позднее описанная как мутация, обладающая эффектом основателя в датской популяции [70], также обнаружена в Канаде [812], Франции [278] и Китае, причем китайские коллеги описали ее в гетерозиготном состоянии у женщины с ГБ, тип IXa, считая, что именно этот вариант гена *PHKA2* явился причиной ее болезни за счет скошенной инактивации X-хромосомы [237]. Мутация *c.557G>A*, *p.R186H* встретилась у 3 (8,8%) пациентов из Московской области, Башкирии и Пермского края. Этот патогенный вариант гена *PHKA2* был описан ранее лишь один раз у пациента с ГБ, тип IXa [197]. Эти три мутации можно считать наиболее характерными мутациями для российских детей с ГБ, тип IXa. Остальные мутации встретились с долями менее 6% (рис. 54).

На втором месте по относительной частоте с наибольшим разнообразием выявленных генетических вариантов оказались мутации гена *GAA*, вызвавшие развитие ГБ, тип II у 27 (21,3%) человек (см. рис. 53), описанные ранее.

Третьими по относительной частоте среди всех типов ГБ оказались мутации гена *AGL*, вызвавшие ГБ, тип III у 23 (18,1%) пациентов (см. рис. 53). Среди 20 (17,1%) различных мутаций, 11 вариантов (55,0%) не были описаны в базе HGMD ранее. Это пять вероятно патогенных миссенс-вариантов: *c.1289T>C*, *p.F430S* (PM1, PM2, PM3, PP3, PP4), встретившаяся у двух неродственных детей из Самарской области и Республики Татарстан в гетерозиготном и гомозиготном состоянии соответственно; *c.1667C>T*, *p.L556P* (PM2, PP1, PP3, PP4, PP5), встретившаяся у двух родных братьев; *c.643G>C*, *p.D215H* (PM2, PM5, PP3, PP4); *c.3775T>G*, *p.W1259G* (PM1, PM2, PP3, PP4) и *c.4532G>A*, *p.C1511Y* (PM2, PM3, PP3, PP4), обнаруженные у единичных пациентов в гетерозиготном состоянии; один патогенный нонсенс-вариант *c.1218T>A*, *p.W406** (PVS1, PM2, PP4); одна патогенная делеция *c.296del*, *p.N99Mfs*9* (PVS1, PM1, PM2, PP4), приводящая к сдвигу рамки считывания и одна вероятно патогенная делеция *c.3313_3315del*, *p.I1105del* (PM1, PM2, PM4, PP4), приводящая к делеции остатка изолейцина, а также один патогенный вариант *c.665-2A>G* (PVS1, PM2, PP4), затрагивающий канонический сайт сплайсинга, и два варианта с неизвестной патогенностью: *c.1735+5G>A* (PM2, PM3, PP4) и *c.1900-13T>A* (PM2, PM3, PP4), которые могут приводить к нарушению сплайсинга.



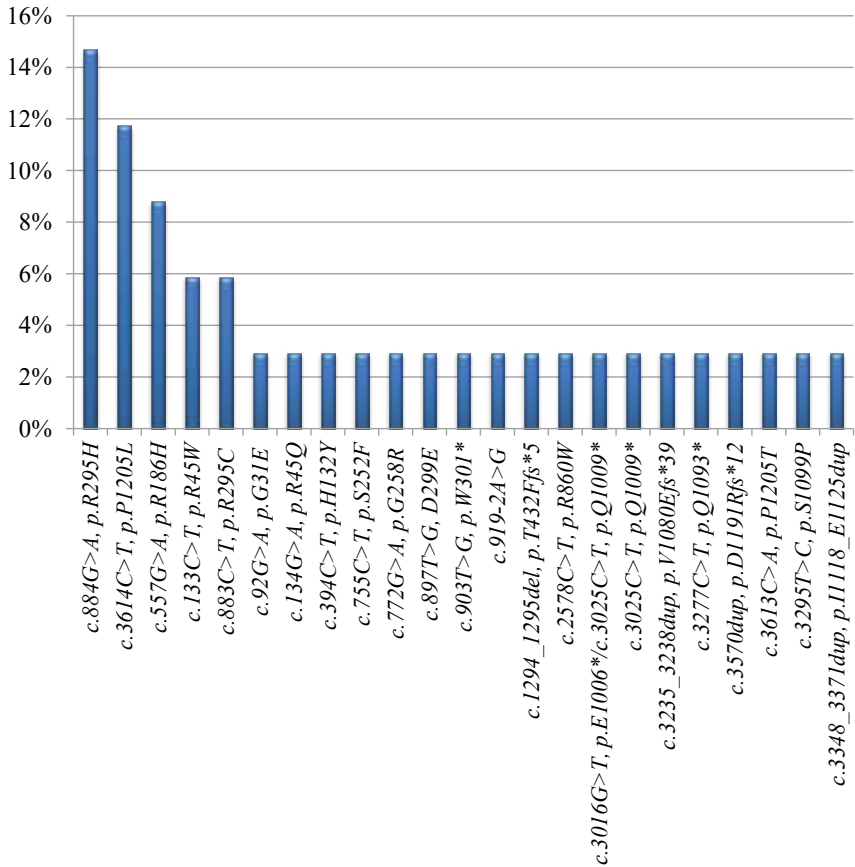


Рис. 54. Относительные частоты и спектр выявленных мутаций гена *PNKA2* (NM_000292.2) у российских детей с ГБ, тип IXa

Нонсенс-мутация *c.3980G>A, p.W1327** была обнаружена нами на 11 (23,9%) аллелях у 9 (39,1%) неродственных пациентов. Эта мутация, впервые описанная итальянскими коллегами у выходца из Туниса [604], позднее была описана как мутация, обладающая эффектом основателя в центральном Тунисе [225], а также как мутация, вызывающая клинические проявления при гетерозиготном носительстве в большой германо-украинской семье [843]. Мутация *c.1423+1G>A*, приводящая к нарушению сплайсинга, была обнаружена нами на 8 (17,4%) аллелях у 5 (21,7%) пациентов, двое из которых были родными братьями, что позволяет считать эти варианты гена *AGL* наиболее характерными мутациями для российских детей с ГБ, тип III. Остальные мутации встретились с долями менее 10% (рис. 55).

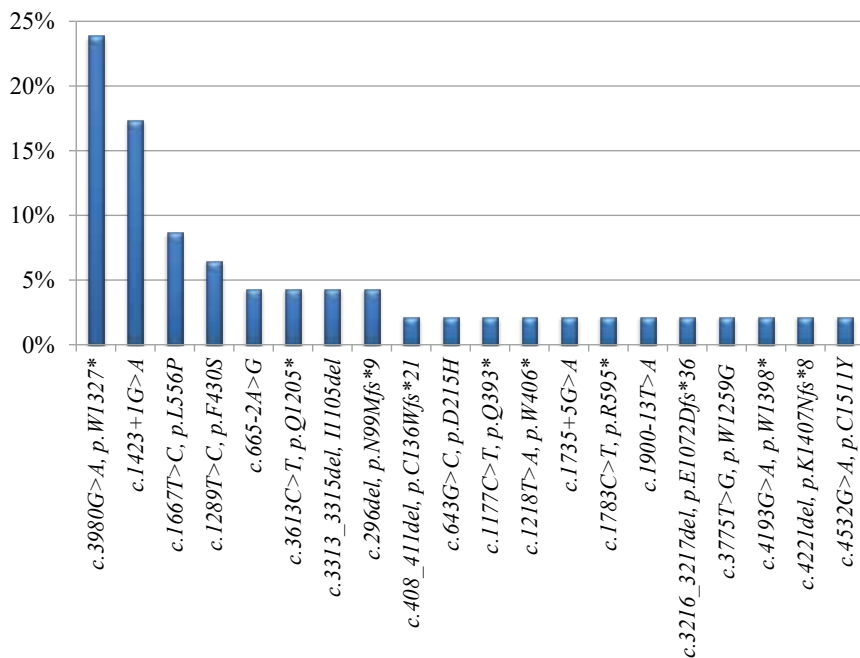


Рис. 55. Относительные частоты и спектр мутаций гена AGL(NM_000028.2) у российских детей с ГБ, тип III

На четвертом месте по относительной частоте оказались мутации гена *SLC37A4*, вызвавшие развитие ГБ, тип Ib у 17 (13,4%) детей (см. рис. 53). Среди выявленных нами 16 (13,7%) различных мутаций, 10 (62,5%) не были описаны в базе данных HGMD. Это пять вероятно патогенных миссенс-вариантов: *c.85A>G, p.K29E* (PM1, PM2, PP3, PP4); *c.209T>C, p.L70P* (PM1, PM2, PP3, PP4); *c.898C>A, p.R300S* (PM2, PM5, PP3, PP4); *c.1016G>T, p.G339V* (PM2, PM5, PP3, PP4) и *c.1081G>T, p.G361C* (PM2, PM3, PP3, PP4, PP5). Предпоследняя встретилась у трех неродственных детей на четырех хромосомах. Один патогенный вариант, нарушающий стартовый кодон: *c.2T>C, p.M1?* (PVS1, PM2, PP4); один патогенный нонсенс-вариант: *c.413G>A p.W138** (PVS1, PM2, PP4), одна вероятно патогенная делеция: *c.708_710del, p.F237del* (PM1, PM2, PM4, PP4) и две патогенные вставки *c.345dup* и *c.1077_1078insG*, приводящие к сдвигам рамок считывания *p.L116Afs*15* (PVS1, PM2, PP4) и *p.N360Efs*42* (PVS1, PM2, PP4) соответственно [63]. Наиболее характерной мутацией для российских детей с ГБ, тип Ib, встретившейся на 14 (41,2%) аллелях у 11 (64,7%) пациентов, двое из которых были сибсами, оказалась делеция *c.1042_1043del*, приводящая к сдвигу рамки считывания *p.L348Vfs*53*. Эта мутация была описана ранее у итальянских пациентов, страдающих ГБ, тип Ib [624, 660]. Второй по частоте



встречаемости оказалась новая мутация *c.1016G>T, p.G339V*, встретившаяся на четырех (11,8%) хромосомах у 3 (17,7%) неродственных детей с ГБ, тип Ib из Москвы, Кировской и Саратовской областей. Остальные мутации встретились с долями менее 10% (рис. 56).

Анализ патогенных вариантов гена *G6PC* продемонстрировал наименьшее разнообразие. Среди трех (2,6%) различных мутаций, выявленных нами у 8 (6,3%) неродственных пациентов (см. рис. 53), не было найдено ни одной новой мутации. При этом мутация *c.247C>T, p.R83C* встретилась у 7 (87,5%) пациентов на 13 (81,3%) хромосомах, что позволяет считать ее мутацией, характерной для российских детей с ГБ, тип Ia (рис. 57). Мутация считается наиболее частой мутацией у европейцев [755], встречаясь с частотой 33% [241], что значительно ниже наших показателей.

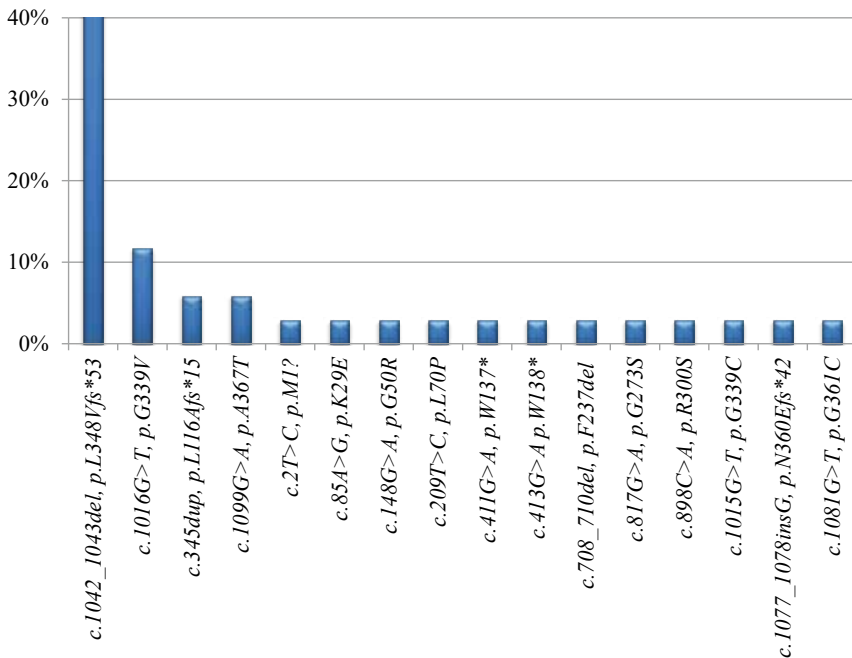


Рис. 56. Относительные частоты и спектр мутаций гена *SLC37A4* (ENST00000545985.1) у детей с ГБ, тип Ib в РФ

Мутации гена *PYGL*, приводящие к развитию ГБ, тип VI были обнаружены у 6 (4,7%) детей из неродственных семей (см. рис. 53). В общей сложности было выявлено семь (6,0%) различных мутаций гена *PYGL*, при этом четыре (57,1%) варианта не были описаны в базе HGMD ранее. Это вероятно патогенные миссенс-варианты: *c.176C>G, p.T59R* (PM2, PM3, PP3, PP4); *c.697G>A, p.G233S* (PM2, PM5, PP3, PP4)

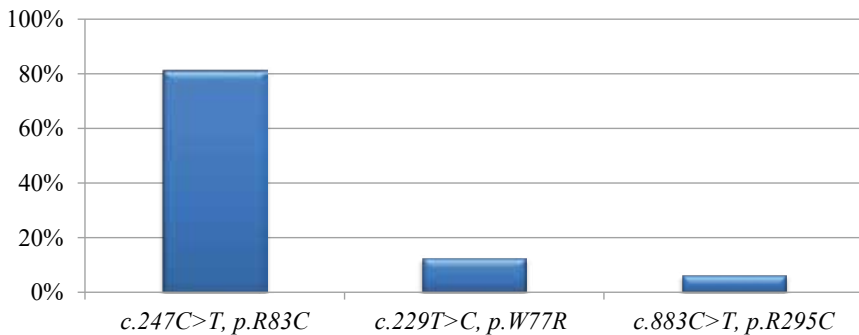


Рис. 57. Относительные частоты и спектр выявленных мутаций гена *G6PC*(NM_000151.3) у детей с ГБ, тип Ia в РФ

(последняя выявлена у двух неродственных детей из Хакасии и Белгородской области) и варианты с неизвестной патогенностью *c.475C>T, p.G159C* (PM2, PP3, PP4); и *c.841T>A, p.Y281N* (PM2, PP3, PP4). Последняя выявлена у одного ребенка в гомозиготном состоянии. Наиболее частой мутацией, обнаруженной у 3 (50,0%) детей на четырех (33,3%) пораженных хромосомах, оказалась мутация *c.38A>C*, что позволяет считать ее характерной для российских детей с ГБ, тип VI. Остальные варианты гена *PYGL* демонстрируют относительно равномерное распределение (рис. 58).

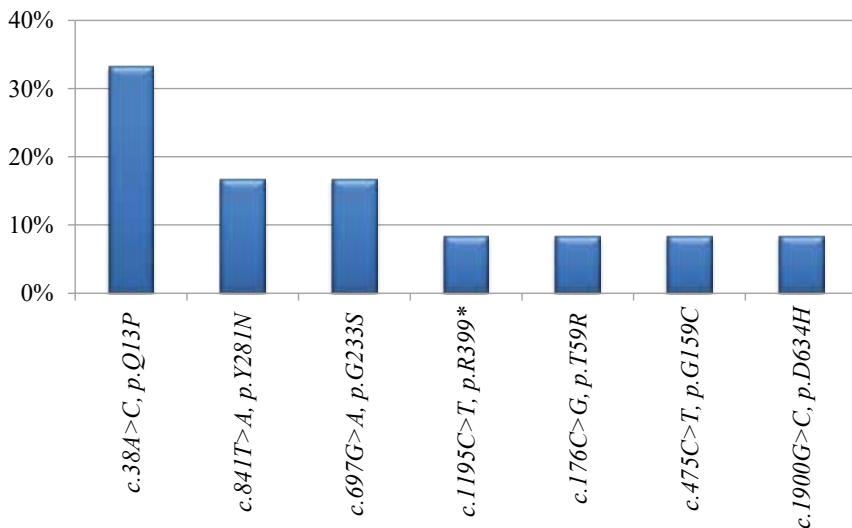


Рис. 58. Относительные частоты и спектр мутаций гена *PYGL*(NM_002863.4) у детей с ГБ, тип VI в РФ

Мутации гена *PHKG2*, приводящие к развитию ГБ, тип IXc, были выявлены у 5 (3,9%) детей из неродственных семей (см. рис. 53). При этом два (40%) обнаруженных варианта из пяти (4,3%) различных мутаций гена не были описаны ранее в базе данных HGMD. Это вероятно патогенные миссенс-варианты: *c.584C>T*, *p.A195V* (PS4, PM2, PP3, PP4), найденный в гомозиготном состоянии у двух детей, родившихся в Дагестане, и *c.658G>A*, *p.G220R* (PM2, PM5, PP3, PP4), найденный в гомозиготном состоянии у одного ребенка. Относительная частота мутации *c.584C>T*, *p.A195V* составила 40%, что позволяет заподозрить тенденцию к ее накоплению среди выходцев из Дагестана. Небольшое число обнаруженных пациентов и относительно равномерное распределение остальных выявленных вариантов не позволяет определить мутации, характерные для российских детей, страдающих ГБ, тип IXc (рис. 59).

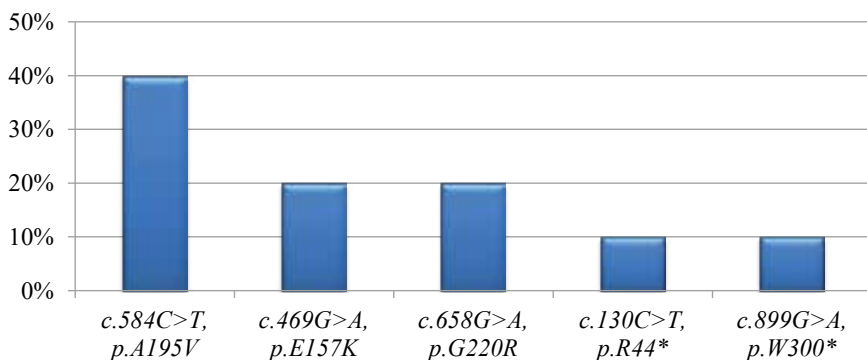


Рис. 59. Относительные частоты и спектр мутаций гена *PHKG2* (NM_000294.2) у российских детей с ГБ, тип IXc

Мутации гена *PHKB*, приводящие к развитию ГБ, тип IXb, были выявлены также у 5 (3,9%) детей из неродственных семей (см. рис. 53). При этом все семь (6,0%) обнаруженных вариантов не были описаны ранее в базе данных HGMD. Это патогенные нонсенс-варианты *c.39G>A*, *p.W13** (PVS1, PM2, PP4), *c.1257T>G*, *p.Y419** (PVS1, PM2, PP4) и *c.2014C>T*, *p.R672** (PVS1, PM2, PP4); вероятно патогенный вариант *c.2326C>T*, *p.R776C* (NM_001031835.2) (PM1, PM2, PP3, PP4), соответствующий *c.2427+977C>T* (NM_000293.2), найденный на трех пораженных хромосомах у двух детей, миссенс-вариант с неизвестной патогенностью *c.824A>G*, *p.N275S* (PM2, PP3, PP4), вероятно патогенная делеция *c.2459_2461del*, *p.E820del* (PM2, PM4, PP4, PP5), а также патогенный вариант *c.594+1G>A* (PVS1, PM2, PP4), приводящий к нарушению канонического сайта сплайсинга (рис. 60). Незначительное число выявленных пациентов с мутациями в гене *PHKB* не позволяет опреде-

лить мутации, характерные для российских детей с ГБ, тип IXb, однако необходимо отметить, что в 30,0% случаев был обнаружен вариант *c.2427+977C>T*, который, по данным программы Alamut Visual (версия 2.15), может приводить к нарушению акцепторного сайта сплайсинга.

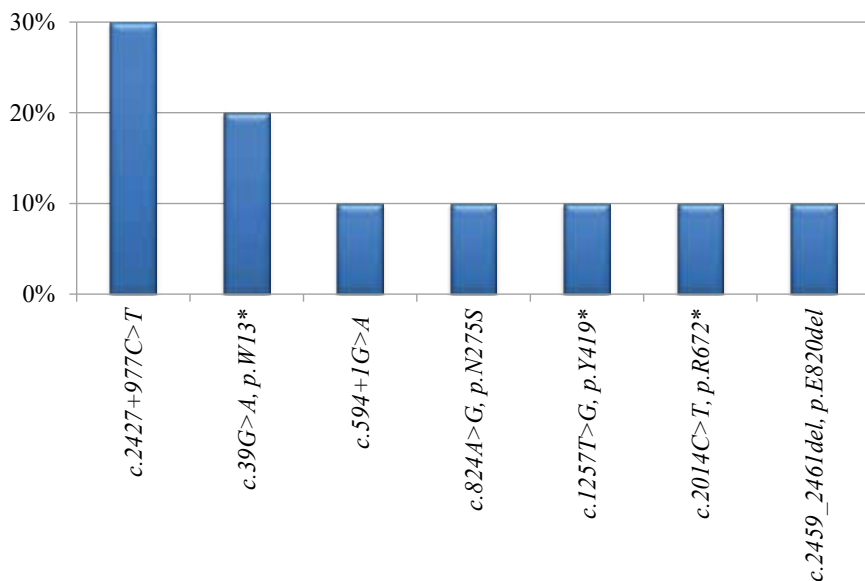


Рис. 60. Относительные частоты и спектр выявленных мутаций гена *PNKB*(NM_000293.2) у российских детей с ГБ, тип IXb

Варианты гена *GBE1* (NM_000158.3), приводящие к развитию ГБ, тип IV, были выявлены у 2 (1,6%) детей из неродственных семей (см. рис. 53). При этом все четыре (3,4%) обнаруженных варианта не были описаны в базе данных HGMD. Это три миссенс-варианта с неизвестной патогенностью: *c.278C>T, p.P93L* (PM2, PP3, PP4); *c.427A>G, p.K143E* (PM2, PP3, PP4, PP5) и *c.1583A>G, p.H528R* (PM2, PP3, PP4, PP5), а также вероятно патогенный вариант *c.614G>A, p.G205E* (PM1, PM2, PP3, PP4), каждый из которых был найден в гетерозиготном состоянии. Равномерное распределение обнаруженных вариантов и незначительное число детей, страдающих ГБ, тип IV, не позволило определить мутации, характерные для российских детей с этим типом ГБ.

Кроме того, один, не описанный ранее миссенс-вариант *c.776T>C, p.L259P*, удалось обнаружить в гене *PNKA1* у ребенка с подозрением на ГБ, однако клиническая картина болезни, указывающая на печеночную форму гликогеноза, а также гемизиготная мутация в гене *PNKA2*, не позволила считать вариант *c.776T>C, p.L259P* гена *PNKA1* этиологической причиной развития болезни.

Суммарно удалось выявить 117 вариантов в девяти различных исследованных генах. Среди них более половины (70 / 59,8%) составляли миссенс-мутации, кроме того, было обнаружено 21 (18%) нонсенс-мутация, 11 (9,4%) небольших делеций, 8 (6,8%) мутаций сайтов сплайсинга, 6 (5,1%) небольших вставок и одна (0,9%) мутация стартового кодона, (рис. 61). При этом мутации, приводящие к преждевременной терминации трансляции либо нарушающие инициацию трансляции, были выявлены у 51 (43,6%) пациента.

Для валидации всех выявленных мутаций методом Сэнгера в целях экономии времени были подобраны и синтезированы олигонуклеотиды на все кодирующие области генов, входящих в исследуемую панель, заблаговременно.

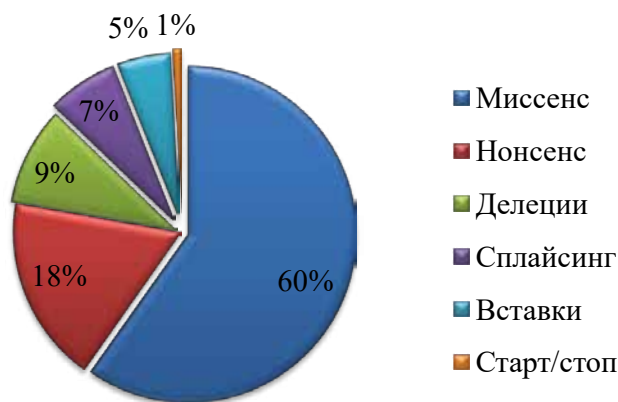


Рис. 61. Доли различных типов мутаций, выявленных у российских пациентов с ГБ

1.3.1.6.3. Описание новых вариантов генов *PHKA2*, *GAA*, *AGL*, *SLC37A4*, *PYGL*, *PHKG2*, *PHKB*, *GBE1*

Не описанные ранее в базе HGMD 62 варианта, составляющие более половины всех обнаруженных мутаций (рис. 62), были подвергнуты семейному и биоинформатическому анализу в соответствии с Руководством по интерпретации данных последовательности ДНК человека [51], как показано выше.

Значительная доля неописанных мутаций свидетельствует о высокой гетерогенности и слабой изученности генетических причин развития ГБ у пациентов, населяющих территорию РФ. В немногочисленных исследованиях генетических причин возникновения ГБ, проведенных в мире, также обращает на себя внимание высокая доля новых мутаций [984, 1001].

Анализ фенотипических проявлений у детей с не описанными ранее вариантами генов *PHKA2*, *GAA*, *AGL*, *SLC37A4*, *PYGL*, *PHKG2*, *PHKB*, *GBE1* позволил в большинстве случаев скорректировать клинические диагнозы, выставленные до проведения молекулярного исследования, а также описать генотип-фенотипические корреляции для 46 пациентов.

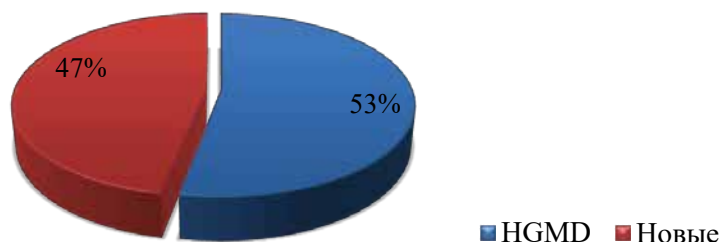


Рис. 62. Соотношение вариантов генов, описанных и не описанных ранее в международной базе данных HGMD, в когорте обследованных детей с ГБ

1.3.1.6.4. Генотип-фенотипические корреляции

Несмотря на существенное число проанализированных пациентов, достоверные генотип-фенотипические корреляции удалось установить лишь для детей с мутациями гена *AGL*. Установлена достоверная ассоциация ранней манифестации ГБ у детей в возрасте до 6 месяцев с мутациями, преждевременно прерывающими синтез кодируемого белка (табл. 41).

Таблица 41. Расчет ассоциации возраста манифестации ГБ с различными типами мутаций гена *AGL*

Возраст манифестации болезни, мес	Число вариантов		p-значение (критерий Фишера)
	нонсенс/фрэймшифт	миссенс	
≤ 6	12	2	0,028
> 6	8	10	

Таким образом, дети, страдающие ГБ, вызванной мутациями, приводящими к преждевременной терминации трансляции, то есть к укороченному белковому продукту, обладают повышенным риском раннего дебюта заболевания в возрасте до 6 месяцев ОШ=7,0 (ДИ 1,1–82,5) по сравнению с пациентами, обладающими миссенс-мутациями (табл. 42).

Таблица 42. Клинические характеристики детей с Гб, описанные при постановке диагноза, вызванного выявленными вариантами генов RNKA2, GAA, AGL, SLC37A4, RUGL, RNKS2, RNKV, SVE1, не описанными ранее. Корреляции генотипа и фенотипа

Ген	Нуклеотидный, аминокислотный вариант 1		Нуклеотидный, аминокислотный вариант 2		Пол	Возраст манифестации, мес	Возраст диагностики, мес	Гепатомегалия	Нейтропения	Спленомегалия	Анемия	Цирроз печени	Фиброз печени	Нефромегалия	ГКМП/миопатия	Задержка физического развития	Остеопения/остеопороз
	СLC37A4	СLC37A4	СLC37A4	СLC37A4													
СLC37A4	c.345dup, p.L116Afs*15	c.1042_1043del, p.L348Vfs*53	М	4	4	+	+	+	+	+	+	н/д	н/д	+	+	н/д	+
СLC37A4	c.411G>A, p.W137*	c.413G>A, p.W138*	М	1	11	+	+	+	+	+	н/д	-	-	+	+	+	н/д
СLC37A4	c.1016G>T, p.G339V	c.1016G>T, p.G339V	М	1	36	+	+	+	+	+	+	-	н/д	+	+	+	-
СLC37A4	c.209T>C, p.L70P	c.898C>A, p.R300S	Ж	1	9	+	-	+	н/д	н/д	-	-	-	+	+	+	н/д
СLC37A4	c.1016G>T, p.G339V	c.1042_1043del, p.L348Vfs*53	М	1	12	+	+	+	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	+	+	н/д	н/д
СLC37A4	c.1016G>T, p.G339V	c.1042_1043del, p.L348Vfs*53	Ж	с ро- ждения	1	+	+	+	+	+	+	-	н/д	+	+	+	+
СLC37A4	c.345dup, p.L116Afs*15	c.1076_1077delinsG, p.R359Rfs*44	М	0,05	72	+	+	+	+	+	+	н/д	+	+	+	-	н/д



Продолжение таблицы 42

Ген	Нуклеотидный вариант 1		Нуклеотидный вариант 2		Пол	Возраст манифестации, мес		Возраст диагностики, мес		Lentomegalia	Нейтропения	Спленомегалия	Анемия	Цирроз печени	Фиброз печени	Нефромегалия	ЖМЛ/миомаля	Задержка физического развития	Остеопения/остеопороз	
	С.85A>G, p.K29E	С.1042_1043del, p.L348Vfs*53	С.148G>A, p.G50R	С.1081G>T, p.G361R		М	10	12	+											+
SLC37A4	С.85A>G, p.K29E	С.1042_1043del, p.L348Vfs*53	С.148G>A, p.G50R	С.1081G>T, p.G361R	Ж	23	48	-	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д
SLC37A4	С.2T>C, p.M1?				Ж	4	189	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AGL	С.708_710del, p.F237del				М	60	92	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AGL	С.643G>C, p.D215H				Ж	11	21	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д
AGL	С.3980G>A, p.W1327*				М	с рож- дения	24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AGL	С.1735+5G>A	С.4221del, p.K1407Nfs*8			М	3	24	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д
AGL	С.1289T>C, p.F430S	С.1289T>C, p.F430S			М	10	15	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д
AGL	С.1667C>T, p.L556P	С.1667C>T, p.L556P			М			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+



Продолжение таблицы 42

Ген	Нуклеотидный вариант 1 Нуклеотидный, аминокислотный вариант 1		Нуклеотидный, аминокислотный вариант 2		Пол	Возраст манифестации, мес	Возраст диагностики, мес	Гепатомегалия	Нейтропения	Сplenомегалия	Анемия	Цирроз печени	Фиброз печени	Нефромегалия	ГКМП/миопатия	Задержка физического развития	Остеопороз
	Нуклеотидный вариант 1	Нуклеотидный, аминокислотный вариант 1	Нуклеотидный, аминокислотный вариант 2	Нуклеотидный вариант 2													
PHKA2	c.755C>T, p.S252F	-	-	-	М	16	22	+	-	+	н/д	н/д	н/д	н/д	-	+	н/д
PHKA2	c.3277C>T, p.Q1093*	-	-	-	М	24	45	+	-	+	н/д	н/д	н/д	-	+	+	н/д
PHKA2	c.903T>G, p.W301*	-	-	-	М	7	52	-	-	-	-	-	-	н/д	н/д	+	-
PHKA2	c.897T>G, D299E	-	-	-	М	30	60	-	-	-	н/д	-	-	-	+	+	н/д
PHKA2	c.3235_3238dup, p.V1080Efs*39	-	-	-	М	8	33	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
PHKA2	c.3613C>A, p.P1205T	-	-	-	М	48	60	-	-	-	-	-	-	-	+	н/д	н/д
PHKA2	c.3016G>T, p.E1006*	-	-	-	М	12	23	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
PHKA2	c.3570dup, p.D1191Rfs*12	-	-	-	М	36	50	-	-	-	н/д	-	-	-	-	+	н/д



PHKA2	c.92G>A, p.G31E	-	М	2,5	60	+	-	+	-	н/д	н/д	+	н/д	+	-
PHKA2	c.1294_1295del, p.T432Ffs*5	-	М	23	28	+	-	-	н/д	-	+	-	н/д	+	н/д
PHKA2	c.3295T>C, p.S1099P	-	М	12	23	+	-	-	+	-	+	-	н/д	+	н/д
PHKA2	c.2578C>T, p.R860W	-	М	0,04	55	+	н/д	-	-	-	-	-	н/д	+	-
PHKA2	c.3348_3371dup, p.I1118_ E1125dup	-	М	8	48	+	+	+	н/д	-	-	-	н/д	+	-
PHKB	c.594+1G>A	c.2014C>T, p.R672*	М	19	28	+	-	-	н/д	-	+	-	н/д	-	-
PHKB	c.2427+977C>T	c.39G>A, p.W13*	Ж	4	13	+	-	-	-	-	н/д	-	н/д	-	н/д
PHKB	c.2427+977C>T	c.2427+977C>T	М	6	62	+	н/д	+	н/д	н/д	н/д	-	н/д	+	н/д
PHKB	c.1257T>G, p.Y419*	c.2459_2461del, p.E820del	М	36	108	+	-	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д
PHKG2	c.584C>T, p.A195V	c.584C>T, p.A195V	М	н/д	н/д	+	н/д	+	н/д	н/д	н/д	-	н/д	н/д	н/д
PHKG2	c.584C>T, p.A195V	c.584C>T, p.A195V	Ж	4	5	+	-	+	н/д	+	-	н/д	н/д	н/д	н/д

Примечание. Жирным шрифтом выделены новые генетические варианты. 2. н/д – нет данных.



1.3.1.6.5. Оптимизация алгоритма генетической диагностики гликогеновых болезней

С учетом высокой частоты и особенной тяжести пациентов с ГБ, тип I, а также с учетом нахождения мажорных мутаций в генах *G6PC* и *SLC37A4*, можно рекомендовать проведение генетической диагностики ГБ, начиная с исследования миссенс-мутации *c.247C>T* гена *G6PC*, на долю которой приходится 81,3% пораженных аллелей детей с ГБ, тип Ia, делеции *c.1042_1043del* и миссенс-мутации *c.1016G>T* гена *SLC37A4*, на долю которых приходится 53,0% пораженных аллелей детей с хотя бы одним зафиксированным эпизодом нейтропении. В случае невыявления этиологических причин ГБ на первом этапе, во второй этап генетической диагностики предлагается включить анализ таргетных областей исследованных нами 20 генов методом высокопроизводительного секвенирования.

1.3.1.6.6. Выводы

Разработанный метод генетической диагностики ГБ позволил поставить точные клинические диагнозы 100 пациентам с преимущественным поражением печени из 109 обследованных, выявив 85 различных вариантов в восьми изученных генах. Благодаря проведенному анализу полученных данных, впервые удалось описать относительные частоты различных типов ГБ у российских детей, среди которых наибольшей долей (34,7%) обладали пациенты с ГБ, тип IX, а наименьшей (1,6%) – пациенты с ГБ, тип IV, определить возрастные и географические особенности развития ГБ, предложить оптимизацию генетической диагностики 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 определить не удалось. 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 ОШ=7,0 (ДИ 1,1–82,5).

1.3.2. БОЛЕЗНЬ ПОМПЕ

Причиной развития ГБ, тип II, служат мутации гена *GAA* (OMIM 606800), кодирующего кислую α -1,4-глюкозидазу, сниженная активность которой приводит к накоплению гликогена преимущественно в сердечной, скелетной и дыхательной мышечных тканях. Тип наследо-



вания мутаций в ряду поколений носит аутосомно-рецессивный характер. Частота встречаемости БП колеблется от 1 случая на 14 000 живых новорожденных [442] до 1 случая на 600 000 живых новорожденных [760] в зависимости от географической или этнической групповой принадлежности, составляя примерно 15% всех форм ГБ. Инфантильная форма болезни чаще всего встречается среди афроамериканцев [638], в южном Китае и на Тайване [580], тогда как взрослая форма болезни распространена в Дании и Нидерландах [107]. Наиболее высокая частота БП была продемонстрирована в результате неонатального скрининга, проведенного в Австрии. Среди 34 736 новорожденных удалось выявить 4 случая БП, что составило рекордные 1 случай на 8684 образца крови, изъятых у новорожденных в период с января по июль 2010 года [650].

БП впервые была описана в 1932 году датским патологоанатомом Йоханнесом Помпе на примере 7-месячной девочки, умершей от идиопатической гипертрофической кардиомиопатии. Помпе обнаружил и описал аномальное «вакуолярное» накопление гликогена во всех исследованных им тканях и органах этой девочки, а также генерализованную мышечную слабость [770]. В том же году в литературе было дано клиническое описание похожих случаев [153, 779]. В 1954 году болезнь была классифицирована как гликогеновая болезнь накопления, тип II [257]. А в 1963 году бельгийский биохимик А. Херц впервые обнаружил и описал фермент α -глюкозидазу, катализирующий гидролиз гликогена в лизосомах при кислом pH, а также обнаружил отсутствие этого фермента у больных ГБ, тип II [433].

В основе патогенеза БП лежит патологическое изменение референсной последовательности гена *GAA*, длиной 18,31 т.п.н., расположенного в хромосомной области 17q25.3 и кодирующего α -глюкозидазу, молекулярной массой 105 кДа и состоящую из 952 аминокислотных остатков [446]. Сниженная активность α -глюкозидазы, функция которой состоит в расщеплении 1,4-гликозидных связей молекул гликогена, расположенных в лизосомах, ведет к накоплению гликогена в клетках всего организма, причем чем ниже активность, тем стремительнее накопление. Патофизиологические механизмы БП изучены не полностью, однако известно, что именно наряду с накоплением гликогена в лизосомах клеток идет процесс аутофагии, который считается основной причиной разрушения мышц у больных со взрослой формой БП [1056]. Анализ миобластов, полученных из искусственно созданных клеточных линий мышечных волокон с БП, продемонстрировал изменения в клетках мышечных волокон, не ограничивающиеся одним лишь увеличением размера лизосом [350]. Схожие изменения были зафиксированы и у человека с помощью флуоресцентной конфокальной

микроскопии, позволившей разделить лизосомы и аутофагосомы при обработке материала различными антителами [785]. Эти исследования показали, что на начальных этапах болезни появляются увеличенные лизосомы, заполняемые гликогеном, по мере разрастания которых в процессе прогрессирования болезни стремительно нарастают аутофагосомы, которые и усугубляют мышечную атрофию за счет аутофагоцитоза с последующей деструкцией мышечных волокон [868]. Причинами такого стремительного аутофагосомального наращивания считаются гипогликемия и окислительный стресс, происходящие во время мышечной дифференцировки [354]. При этом для тяжелой, инфантильной формы БП основополагающим фактором разрушения мышечных волокон является накопление гликогена с последующим разрывом лизосом и высвобождением гликогена в цитоплазму [941], тогда как для более мягкой, неинфантильной формы БП решающее значение в процессе разрушения мышечных волокон оказывает аутофагия, деструктурирующая клетки [705]. Исследование патофизиологических основ формирования различных фенотипов БП продолжается, однако бесспорным остается тот факт, что именно сниженная ферментативная активность запускает патологический процесс разрушения мышечных волокон на молекулярном уровне [228]. Именно остаточная активность фермента во многом определяет возраст манифестации, тяжесть и скорость прогрессирования болезни, а значит, и общепринятую градацию БП на две формы: инфантильную форму (классическую и неклассическую) и неинфантильную. Клинические рекомендации, утвержденные в 2017 году, также подразделяют БП на два варианта в зависимости от возраста манифестации симптомов: младенческая БП и БП с поздним началом [26].

Классическая инфантильная форма БП может проявиться в утробе матери, но чаще манифестирует в первые 2 месяца жизни с гипотонии, общей мышечной слабости и респираторного дистресс-синдрома, развиваются кардиомегалия, макроглоссия и гепатоспленомегалия. Симптомы гипертрофической кардиомиопатии могут варьироваться в широких пределах: больные дети могут испытывать одышку при физической нагрузке, усталость, повышенную потливость, боль или дискомфорт в груди, нерегулярное сердцебиение, головокружение или эпизоды обморока. Больные дети испытывают трудности с приемом пищи [971] и зачастую требуют кохлеарной имплантации в связи с частичной потерей слуха [959]. Инфантильная форма БП характеризуется практически полным отсутствием активности α -глюкозидазы и быстрым накоплением гликогена в скелетных мышцах и в сердце. При отсутствии лечения смерть обычно наступает в течение первого года жизни из-за сердечной или легочной недостаточности [525].

Неклассическая инфантильная форма БП, описанная Slonim с соавторами, манифестирует на первом году жизни с моторного дефицита и медленно прогрессирующей мышечной дистрофии [884]. Несмотря на развивающуюся кардиомегалию, сердечно-сосудистые болезни нельзя считать основными клиническими проявлениями этой формы болезни, сопровождающейся птозом, гепатомегалией, сколиозом и контрактурами суставов. Основное отличие от классической формы – отсутствие кардиомиопатии [210, 961]. Больные дети также могут испытывать трудности при жевании и/или глотании. При отсутствии лечения смерть наступает от дыхательной недостаточности в раннем детстве.

ГБ, тип II с поздним началом, так называемая неинфантильная форма, обычно манифестирует между второй и шестой декадами жизни и характеризуется медленно прогрессирующей пояснично-конечностной миопатией [774], что заставляет людей пользоваться инвалидными колясками. Нижние конечности страдают чаще верхних. Возраст начала болезни прямо пропорционален тяжести состояния и скорости прогрессирования. Сердечно-сосудистые проявления поздней формы БП обычно манифестируют с синдрома Вольфа–Паркинсона–Уайта, гипертрофии левого желудочка и синдрома восходящей аорты, тогда как синдром ригидного позвоночника, сколиоз и низкий вес тела приводят к постуральным аномалиям [846]. Прогрессирующая дистрофия скелетных мышц протекает медленнее, чем в инфантильных формах, и в конечном итоге вовлекает диафрагмальные и дыхательные мышцы [1026]. Среди нелеченных пациентов средний возраст к моменту постановки диагноза составляет 38 лет, медиана выживаемости после постановки диагноза составляет 27 лет, а средний возраст к моменту смерти составляет 55 лет (диапазон 23–77 лет); при этом самой частой причиной смерти является дыхательная недостаточность [409]. Мужской пол, степень дистрофии скелетных мышц и продолжительность заболевания являются факторами риска развития тяжелой дыхательной недостаточности [962]. Многоцентровые исследования признают, что разделение на формы БП в зависимости от возраста дебюта носят весьма условный характер, а зачастую и вовсе нецелесообразны [963], так как первые симптомы БП с поздним началом могут проявиться в раннем детстве, во взрослом и пожилом возрасте [131].

Диагностика БП проводится с помощью функциональных и лабораторных методов при подозрении, возникшем на основании анализа клинической картины пациента. К надежным методам функциональной диагностики относят электромиографию, которая позволяет достоверно документировать миопатию инфантильной формы, тогда как для взрослой формы зачастую требуется игольчатая электромиография спинномозговых мышц [445]. Исследования нервной проводи-

мости используются для измерения скорости как в случае моторных, так и в случае сенсорных нервов. Ангиография и магнитно-резонансная ангиография позволяют обнаружить аневризмы, представляющие собой накопление гликогена в сосудах головного мозга. Биохимические анализы крови включают измерения креатининкиназы в сыворотке крови для выявления ювенильной формы БП [558]. Однако этот метод нельзя считать специфическим, так как креатининкиназа может значительно превышать референсные интервалы при многих заболеваниях, так же как и измеряемый в моче тетрасахарид глюкозы, значительно повышающийся при БП, повышается и при других ГБ [1045]. Золотым стандартом диагностики БП уже более 10 лет считается измерение ферментативной активности кислой α -глюкозидазы в сухих пятнах крови с помощью технологии тандемной масс-спектрометрии [1051] либо в тканях, полученных из биопсийного материала кожи. Последний вариант диагностики применяется все реже, так как занимает от 4 до 6 недель из-за длительного культивирования клеточного материала. В настоящее время и мышечная биопсия не находит первоначального применения в связи с инвазивностью процедуры, однако такие измерения наглядно свидетельствуют о значительном повышении гликогена в мышечной ткани пациентов с инфантильной формой БП по сравнению с уровнем гликогена у пациентов со взрослой формой БП. При измерении α -глюкозидазы возможно получение ложноотрицательных результатов из-за интерференции с другими ферментами, такими как глюкозидаза II (GANAB), нейтральная α -глюкозидаза C (GANC) мальтаза-глюкоамилаза (MGAM) [296]. Дело в том, что сродство α -глюкозидазы по отношению к своему природному субстрату (гликогену) гораздо выше, чем по отношению к искусственному субстрату (4-метилумбеллиферил- α -D-глюкопиранозид), используемому в диагностике, с которым и происходит конкурентное связывание [1027]. Мышечная ткань и культивированные фибробласты не содержат MGAM и позволяют измерять активность α -глюкозидазы как отношение активности нейтральной глюкозидазы к кислой глюкозидазе (GANAB+GANC/GAA). Поскольку MGAM экспрессируется в нейтрофилах, а не в лимфоцитах, эту же формулу вычисления активности α -глюкозидазы также используют для диагностики БП в очищенных лимфоцитах. Используя мальтозу или акарбозу в качестве ингибитора активности MGAM, стало возможно проводить измерение активности α -глюкозидазы в сухих пятнах крови. Именно это измерение теперь служит основой для скрининга новорожденных на БП [721, 1051]. Подтверждающей диагностикой, позволяющей исключить ложноположительные результаты ферментативной диагностики, является молекулярно-генетическая диагностика, зачастую проводимая с использованием метода

классического двунаправленного секвенирования кодирующих и прилегающих интронных областей гена *GAA*. Выявление мутаций позволяет спрогнозировать и тяжесть БП, используя фенотипические корреляции, выявленные ранее. К настоящему времени в базе HGMD описано 497 патогенных вариантов гена *GAA*, 300 (60%) из которых составляют миссенс/нонсенс-мутации, 109 (22%) – небольшие делеции / инсерции, 67 (13,5%) – варианты гена, оказывающие влияние на сплайсинг, и 21 (4,5%) – варианты, включающие протяженные делеции / инсерции и структурные перестройки [467]. Комбинации мутаций, которые приводят к полному отсутствию активности α -глюкозидазы, наблюдаются чаще у лиц с инфантильной формой болезни, в то время как остальные комбинации позволяют выявлять остаточную активность фермента с более поздними клиническими проявлениями БП [706]. Наиболее частой мутацией гена *GAA* является сплайсинговая мутация *c.-32-13G>A*, на которую приходится более половины всех выявленных у европейцев случаев взрослой формы БП [459]. Наиболее частой мутацией гена *GAA* среди монголоидных пациентов с инфантильной формой БП является миссенс-мутация *p.Asp645Glu* [870]. Среди африканцев и афроамериканцев с инфантильной формой БП чаще всего встречается нонсенс-мутация *p.Arg854X* гена *GAA* [128]. У датчан с инфантильной формой БП преобладает делеция экзона 18 гена *GAA*, либо *c.525del* [107]. Такие находки позволяют предполагать эффект основателя для БП в этих популяционных группах. Подавляющее большинство мутаций не имеет строгих корреляций с фенотипом заболевания, о чем свидетельствуют значительные различия в тяжести болезни у пациентов в рамках одной семьи, особенно для БП с поздним началом [1015], по сравнению с инфантильной формой [886]. Одни и те же мутации встречаются у больных разными формами болезни, но с различными частотами. К примеру, *c.525del* в 13,8% случаев встречается при младенческой форме и лишь в 3,8% случаев при взрослой форме БП среди итальянцев, тогда как *c.2237G>A*, напротив, в 3,4% встречается среди детей раннего возраста и в 10,3% случаев у взрослых [762, 763]. Наиболее ярким примером генотипического различия, предопределяющего тяжесть клинической картины, служит сплайсинговая мутация *c.-32-13T>G*, которая никогда не встречается в гомозиготном состоянии среди пациентов с классической инфантильной формой БП [283]. Однако очевидно, что компаунд-гетерозиготное носительство *c.-32-13T>G* с мутациями, вызывающими тяжелый фенотип БП, способно приводить к тяжелым клиническим проявлениям [796]. Сочетание двух нуклеотидных вариантов гена *GAA*: *c.1726G>A* (*p.G576S*) и *c.2065G>A* (*p.E689K*), известное как псевдодефицитный комплексный аллель, приводит к сниженной активности α -глюкозидазы у здоровых

людей и является довольно распространенным явлением в азиатских популяциях [549, 914]. Среди здоровых японцев приблизительно 3,9% новорожденных являются носителями этого комплексного аллеля в гомозиготном состоянии, что значительно осложняет скрининг новорожденных, демонстрируя ложноположительные значения ферментативной активности в этой популяции [550]. Имеющиеся данные показывают, что существуют различия в экспрессии GAA в различных тканях, и что патогенез заболевания является гораздо более сложным, чем считалось ранее [868]. В некоторых работах авторы приводят доказательства того, что даже полиморфизмы других генов, таких как ACE и ACTN3, способны модифицировать фенотип БП [283]. По данным Международного регистра, 70% пациентов имели БП с поздним началом и 78% больных была назначена ФЗТ [202].

Лечение БП требует скоординированных усилий команды специалистов, имеющих опыт в лечении нервно-мышечных нарушений. Педиатры или терапевты, неврологи, ортопеды, кардиологи, диетологи и другие специалисты должны планировать лечение и систематически наблюдать за его ходом. Наиболее эффективным средством лечения БП является ранняя ФЗТ. В апреле 2006 года Комитет по контролю за продуктами и лекарствами (FDA) США одобрил препарат Myozyme® (алглюкозидаза альфа), произведенный корпорацией «Джензайм» для ФЗТ пациентов с инфантильной формой БП. Lumizyme®, произведенный корпорацией «Джензайм», был одобрен FDA в 2010 году для ФЗТ пациентов старше 8 лет. Одни исследования показали неплохую эффективность лечения пациентов разных возрастов, страдающих ГБ, тип II с поздним началом [907], тогда как другие доказали слабую эффективность алглюкозидазы альфа для лечения взрослой формы БП [896]. При этом все специалисты сходятся во мнении, что ФЗТ сама по себе значительно увеличивает выживаемость, уменьшает кардиомегалию, а также улучшает функции сердца и скелетных мышц. Лучший ответ скелетных мышц на препарат был отмечен у пациентов с ранним началом ФЗТ, до тяжелого повреждения скелетных мышц [526].

В ближайшее время альтернативным методом лечения инфантильной формы БП может стать мышечный таргетинг посредством рекомбинантных аденовирусных векторов, эффективность которого была доказана на нокаутных мышях, приводя к постоянной коррекции содержания мышечного гликогена как в сердечной, так и в скелетной тканях [264, 909]. Кроме того, активно разрабатываются и даже применяются наряду с ФЗТ: шаперонотерапия, генотерапия, а также терапия, направленная на снижение накопления гликогена [799].

В некоторых случаях тщательное соблюдение диетического режима может уменьшить размер печени, предотвратить гипоглике-

мию, задержку роста и развития. Диета с высоким содержанием белка, включающего аминокислоты с разветвленной цепью, может замедлить прогрессирование болезни и оказаться особенно полезной для лечения пациентов со взрослой формой БП. Большинству пациентов, имеющих ту или иную степень дыхательной недостаточности, требуется респираторная поддержка. Некоторые пациенты могут нуждаться в дыхательной помощи в ночное время суток, особенно при инфекциях дыхательных путей. Физиотерапия рекомендуется для укрепления дыхательных мышц и улучшения физических кондиций. Для лечения контрактур и деформации позвоночника может потребоваться хирургическое вмешательство, как и в случаях пересадки печени.

Своевременная диагностика и раннее начало патогенетической и симптоматической терапии способны существенно улучшить состояние большинства больных ГБ, тип II, поэтому в настоящей работе особое внимание было уделено разработке высокопроизводительного метода ранней биохимической диагностики БП, а также оптимизации молекулярно-генетической диагностики ввиду значительной протяженности гена *GAA*.

1.3.2.1. Селективный скрининг болезни Помпе у российских пациентов

Разработанный и валидированный метод определения сниженной активности кислой α -1,4-глюкозидазы в пятнах крови, высушенных на фильтровальной бумаге, позволил выявить 21 пациента в возрасте от 1 месяца до 62 лет с активностью фермента от 0,03 до 2,09 мкМ/л/ч при селективном скрининге 2978 пациентов, у которых была заподозрена БП. При этом у двух пациентов после проведения молекулярно-генетического исследования были выявлены нуклеотидные варианты *c.1726G>A*, *p.G576S* и *c.2065G>A*, *p.E689K* в гене *GAA*, описанные ранее как псевдодефицитные [641], которые явились причиной двух ложноположительных значений активности кислой α -1,4-глюкозидазы.

До проведения селективного скрининга нами была выбрана отрезная точка 2,30 мкмоль/л/ч для определения активности кислой α -1,4-глюкозидазы. Значение этой отрезной точки было выбрано на основе значения отрезной точки в работах зарубежных авторов [160, 850], а также с учетом полученных нами референсных значений активности α -1,4-глюкозидазы и значений активности этого фермента в группе пациентов с БП.

Согласно полученным данным, были рассчитаны чувствительность и специфичность метода определения активности кислой α -1,4-глюкозидазы. При выбранной отрезной точке, равной 2,30 мкмоль/л/ч,

чувствительность метода составила 100%, а специфичность – 99,01%. В результате проведенного ROC-анализа была скорректирована оптимальная отрезная точка для определения активности α -1,4-глюкозидазы. Новое значение отрезной точки составило 2,15 мкмоль/л/ч, что соответствовало чувствительности 100% и позволило увеличить специфичность методики до 99,5% за счет переноса значения ферментативной активности пациента, показавшего ложноположительный результат в группу истинно отрицательных (рис. 63).

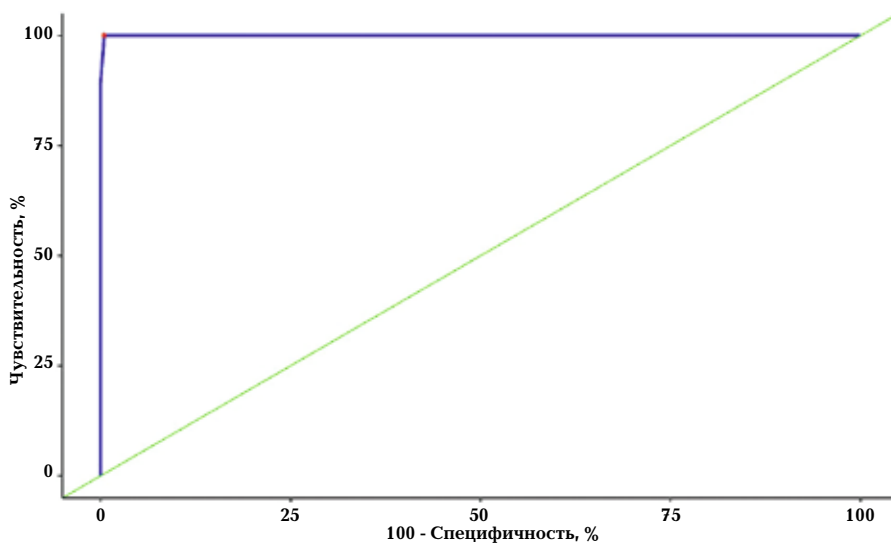


Рис. 63. ROC-кривая метода определения активности α -1,4-глюкозидазы

1.3.2.2. Клинические и генетические особенности болезни Помпе у российских пациентов

Для подтверждения БП у 21 пациента со сниженной ферментативной активностью, а также для выявления мутаций у восьми пациентов, диагноз которым был поставлен до проведения описываемого скрининга, был разработан метод, позволяющий выявлять мутации в кодирующих и прилегающих интронных областях гена *GAA*, в результате чего удалось обнаружить и охарактеризовать патогенные варианты в общей сложности у 27 пациентов с БП: 14 (51,9%) женщин, 13 (48,2%) мужчин в возрасте от 1 месяца до 62 лет, медиана 10 лет. В общей сложности у 14 пациентов была установлена младенческая форма БП, у 11 пациентов – БП с поздним началом, информация о подтипе БП у двух пациентов отсутствует. Возрастные и клинические особенности БП были описаны для 11 пациентов с младенческой

формой БП и лишь для 5 пациентов с БП с поздним началом, так как для трех пациентов с младенческой формой клиническая информация отсутствовала, а возраст остальных пациентов превышал 18 лет. Манифестировала младенческая форма БП у обследованных пациентов в среднем в 2 месяца, медиана – с рождения, тогда как БП с поздним началом манифестировала в среднем в 6 лет и 2 месяца, медиана – 7 лет.

Клинические особенности пациентов с младенческой и поздней формами БП представлены на рис. 64.

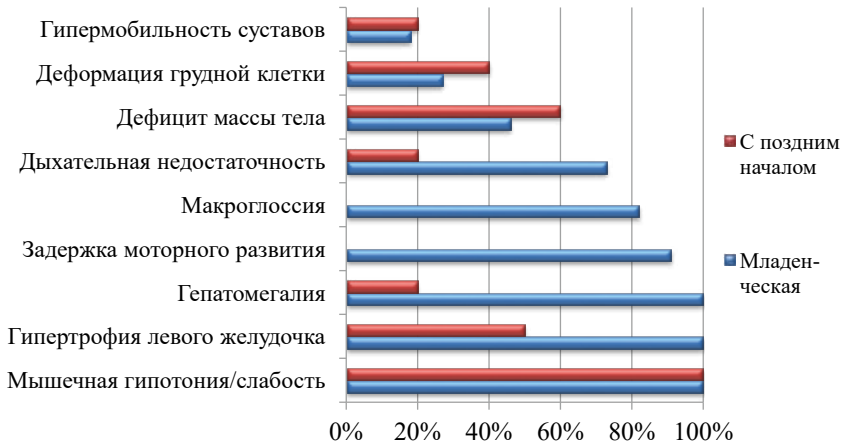


Рис. 64. Частоты различных клинических проявлений БП среди описываемых пациентов

У всех обследованных пациентов младенческая форма БП характеризовалась диффузной мышечной гипотонией, ГКМП, массивной кардиомегалией и гепатомегалией. Задержка моторного развития была обнаружена у 10 (90,9%) детей, макроглоссия – у 9 (81,8%), дыхательная недостаточность – у 8 (72,7%), дефицит массы тела – у 5 (45,5%), деформация грудной клетки – у 3 (27,3%), гипермобильность суставов – у 2 (18,2%) детей. Все пациенты с БП с поздним началом страдали от мышечной слабости; ГКМП была выявлена у 50% пациентов, дефицит массы тела наблюдался у 60%, рахитообразные изменения скелета – у 40%, гепатомегалия и гипермобильность суставов – у 20%. Наши данные в целом сочетаются с данными, описанными в публикациях зарубежных коллег [351, 517, 733].

В результате проведенного исследования удалось выявить 32 патогенных варианта гена *GAA*, явившихся причиной развития БП у 27 обследованных пациентов из 25 неродственных российских семей (рис. 65).

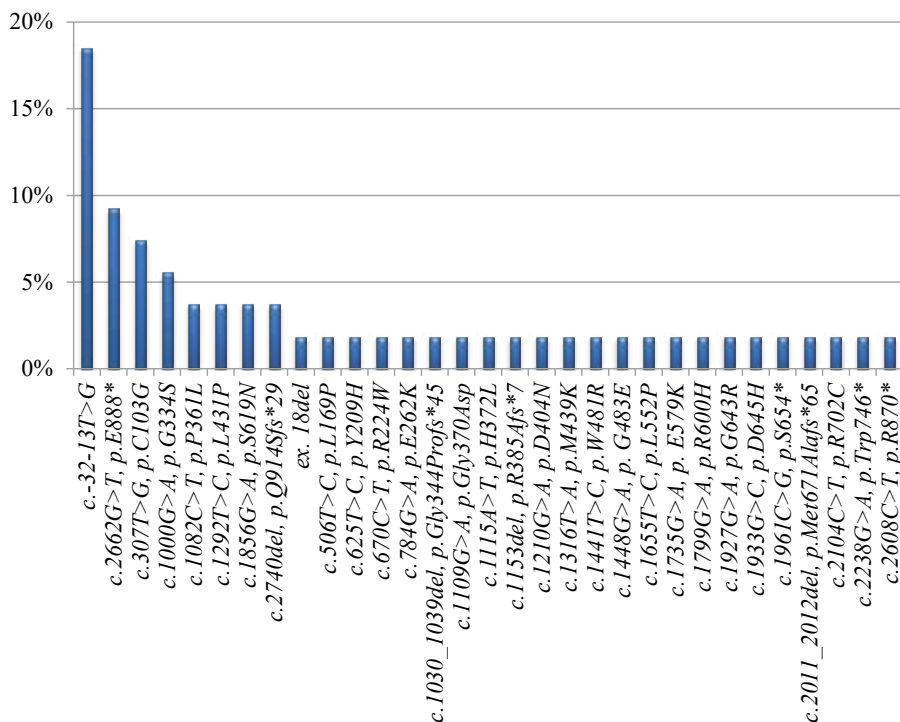


Рис. 65. Относительные частоты и спектр мутаций гена *GAA*, выявленные у обследованных пациентов с БП

Наибольшей долей обладала сплайсинговая мутация *c.-32-13T>G*, расположенная в промотерной области гена *GAA* и встретившаяся на 10 (18,5%) аллелях у 10 (37,0%) пациентов, страдающих БП с поздним началом: у трех мужчин и семи женщин, две из которых были родными сестрами, в возрасте от 26 до 62 лет на момент проведения диагностики. Мутация была описана ранее как мажорная и в других популяционных группах [598]. Она формирует генотип 86% пациентов, страдающих БП с поздним началом [417, 722], что согласуется с данными нашего исследования (90,9%). Второй по относительной частоте оказалась нонсенс-мутация *c.2662G>T, p.E888**, обнаруженная на пяти (9,3%) пораженных хромосомах у пяти (18,5%) пациентов в четырех неродственных семьях. Эта мутация также была описана как мажорная мутация в ряде других исследований и считается мутацией, вызывающей ювенильную форму БП с тяжелым фенотипом [223, 556]. У двух пациентов, генотип которых был представлен этой мутацией в гетерозиготном состоянии, БП манифестировала в первые месяцы жизни и сопровождалась тяжелой прогрессирующей мышечной и сер-



дечной слабостью. Один из них погиб от сердечной недостаточности, несмотря на проводимую патогенетическую терапию. Клинические проявления БП у третьего пациента манифестировали в позднем возрасте, что может быть связано с наличием мутации *c.-32-13T>G* в качестве второго аллеля, сформировавшего генотип. Это предположение подтверждается другими учеными [543]. Клиническая картина БП у двух оставшихся мужчин из одной семьи неизвестна, однако известно, что БП была диагностирована у них в возрасте 35 и 52 лет, при этом вторым аллелем являлась мутация *c.1856G>A*, *p.S619N*, числящаяся в базе данных Pompe Erasmus database у трех пациентов с БП с поздним началом [769]. Мутация *c.307T>G*, *p.C103G*, вызывающая младенческую форму БП [767], представлена в нашем исследовании четырьмя (7,4%) аллелями, обнаруженными у четырех детей. У трех – с младенческой формой БП, манифестировавшей в возрасте от двух до пяти месяцев. У четвертого пациента БП была диагностирована в возрасте 34 лет, при этом второй мутацией была *c.-32-13T>G*, что подчеркивает ее тяжесть при отсутствии «мягких» вариантов гена *GAA*. Мутация *c.1000G>A*, *p.G334S*, описанная ранее у пациента с детской неинфантильной формой БП [621] была выявлена на трех (5,6%) хромосомах у двух детей с БП. Генотип, формируемый гомозиготной мутацией *c.1000G>A* у десятилетней девочки, также позволяет предположить, что она ассоциирована с БП с поздним началом, манифестирующей в ювенильном возрасте, тогда как ранняя манифестация БП у мальчика, по всей видимости, связана со второй мутацией *c.1735G>A*, *p.E579K*, ассоциированной с инфантильной формой БП [432]. Остальные патогенные варианты гена *GAA* были выявлены с долями менее 5%. Мутации *c.1082C>T*, *p.P361L*; *c.1292T>C*, *p.L431P*, *c.1856G>A*, *p.S619N* и *c.2740del*, *p.Q914Sfs*29* встретились дважды. Остальные мутации встретились единожды.

Среди обнаруженных мутаций гена *GAA* значительно преобладали (21/68%) миссенс-мутации, вторыми по частоте (5/16%) были делеции; кроме того, были найдены четыре (13%) различные нонсенс-мутации и одна (3%) мутация сайта сплайсинга (рис. 66). Варианты, преждевременно терминирующие кодируемый белок, составили 29,0% всех выявленных вариантов и были найдены у 13 (48,2%) пациентов.

Отдельно следует отметить нуклеотидные варианты *c.1726G>A*, *p.G576S* и *c.2065G>A*, *p.E689K*, обнаруженные у двух пациентов с незначительным снижением ферментативной активности. Оба нуклеотидных варианта, усредненная мировая частота которых составляет 1,7% и 5,5% соответственно, были описаны ранее у пациентов со сниженной (псевдодефицитной) активностью кислоты

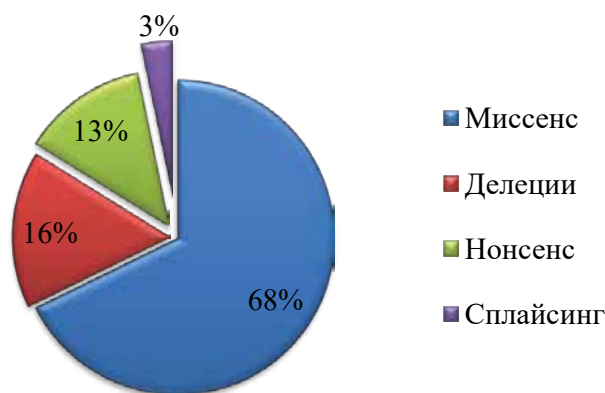


Рис. 66. Распределение различных типов мутаций гена *GAA* у российских пациентов с БП

α -1,4-глюкозидазы, они не являются этиологическими причинами развития БП как в гетерозиготном, так и в гомозиготном состоянии [549, 556, 914].

Разработанный метод молекулярно-генетической диагностики БП с помощью двунаправленного секвенирования по Сэнгеру позволил выявить лишь одну гетерозиготу *c.1655T>C*, *p.L552P*, описанную ранее в гомозиготном состоянии у пациента с младенческой формой БП [762]. Это заставило нас воспользоваться методом MLPA для поиска протяженных делеций и дупликаций, в результате чего была обнаружена делеция экзона 18 гена *GAA* в гетерозиготном состоянии, также описанная ранее у пациента с инфантильной формой БП [733]. Эти находки могут свидетельствовать в пользу четырехстадийного алгоритма диагностики БП, доказывая отсутствие единственного универсального метода диагностики БП в настоящее время.

1.3.2.3. Описание новых патогенных вариантов гена *GAA*

У 9 (33,3%) пациентов были выявлены 9 (28,1%) не описанных в базе HGMD вариантов гена *GAA* (рис. 67), среди которых преобладали пять новых 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 новые небольшие 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 новая 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* (табл. 43).

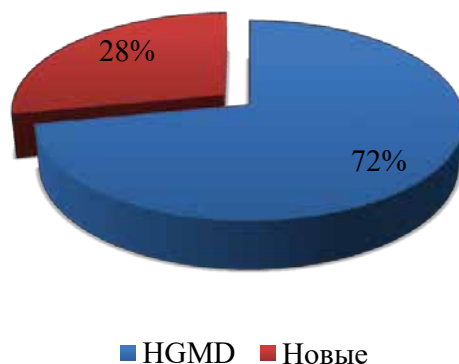


Рис. 67. Соотношение патогенных вариантов гена *GAA*, описанных и не описанных ранее в международной базе данных HGMD

Кроме того, все пять миссенс-мутаций предсказываются как патогенные в соответствии с биоинформатическим расчетом, проведенным с использованием программы Alamut Visual, а также посредством семейного анализа сегрегации.

Таблица 43. Клинические характеристики пациентов с БП, геном которых содержит патогенные варианты гена GAA, не описанные ранее в базе данных HGMD. Корреляции генотипа и фенотипа

Нуклеотидный, аминокислотный вариант 1	Форма B1, описанная в базе данных Rotterdam (Erasmus) [768]	Нуклеотидный, аминокислотный вариант 2	Форма B1 у нашего пациента	Возраст манифестации, мес	Возраст диагностики, мес	Пол	Гепатомегалия	Мышечная гипотония	Мышечная слабость	ГЛЖ	Макроглоссия	Дыхательная недостаточность	Задержка моторного развития	Дефицит массы тела	Контрактуры суставов	Среденный торб, рахит	Ригидный позвоночник, сколиоз	Глухота
c.1292T>C, p.L431P	н/о	c.1292T>C, p.L431P	млад	с рождения	4	ж	+	+	+	+	+	+	+					
c.1210G>A, p.D404N	млад	c.2853G>T, p.W951C	млад	с рождения	24	ж	+	+	+	+		+	+					
c.307T>G, p.C103G	млад	c.1030_1039del, p.G344Pfs*45	млад	5	9	м	+	+	+	+	+	+	+	+				
c.1799G>A, p.R600H	млад	c.2011_2012del, p.M671Afs*65	млад	с рождения	3	ж	+	+	+	+	+	+	+	+				+
c.1441T>C, p.W481R	млад	c.1109G>A, p.G370D	млад	с рождения	4	м	+	+	+	+	+	+	+			+		
c.2740del, p.Q914Sfs*29	н/о	c.2740del, p.Q914Sfs*29	млад	с рождения	1	ж	+	+	+	+	+	+						
c.1933G>C, p.D645H	млад	c.625T>C, p.Y209H	позд	35	39	м		+							+		+	
c.784G>A, p.E262K	млад	c.1448G>A, p.G483E	позд	н/д	240	ж	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д
c.-32-13T>G	позд	c.1961C>G, p.S654*	позд	н/д	468	ж	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д

Примечание. Жирным шрифтом выделены новые генетические варианты. 2. Принятые сокращения: БП – болезнь Помпе; ГЛЖ – гипертрофия левого желудочка; млад – младенческая форма БП; н/д – нет данных; позд – БП с поздним началом.



1.3.2.4. Генотип-фенотипические корреляции

Сравнительно небольшое число обследованных нами пациентов с БП позволило обнаружить феногенотипические корреляции. 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 (табл. 44).

Таблица 44. Расчет корреляции возрастных особенностей БП со сплайсинговой мутацией *c.-32-13T>G*

Возрастные характеристики	Мутация <i>c.-32-13T>G</i>	Другие мутации	р-значение (критерий Манна-Уитни)
Возраст манифестации, мес	219 (3–362)	2 (0,03–6)	<0,001
Возраст диагностики, мес	468 (372–607)	10 (4–130)	<0,001

Примечание. Возрастные характеристики представлены значениями медианы и квартилями распределения признаков (25–75%).

Обращает на себя внимание, что в нашем исследовании сплайсинговая мутация *c.-32-13T>G* встретила лишь у одного пациента с классической младенческой формой БП и мутацией *c.307T>G*, *p.C103G* в компаунд-гетерозиготном состоянии [57]. В остальных девяти случаях *c.-32-13T>G* обусловила развитие БП с поздним началом, даже в компаунд-гетерозиготном состоянии с нонсенс-мутациями *c.1961C>G*, *p.Ser654**, *c.2662G>T*, *p.E888** и *c.2238G>A*, *p.Trp746**. Выявленная тенденция позволяет предположить, что в некоторых случаях знание генотипа может служить важным прогностическим фактором для предсказания фенотипа пациентов с БП, определяя подтип болезни и корректируя терапию, что приобретает особую значимость в рамках неонатального скрининга.

1.3.2.5. Оптимизация алгоритма генетической диагностики болезни Помпе

Все выявленные мутации в целом равномерно распределены по всем кодирующим эксонам гена *GAA* с наибольшим разнообразием в экзоне 15 (4/12,9%). При этом в экзонах 6, 10, 12 и 19 не было выявлено ни одного патогенного варианта (рис. 68).

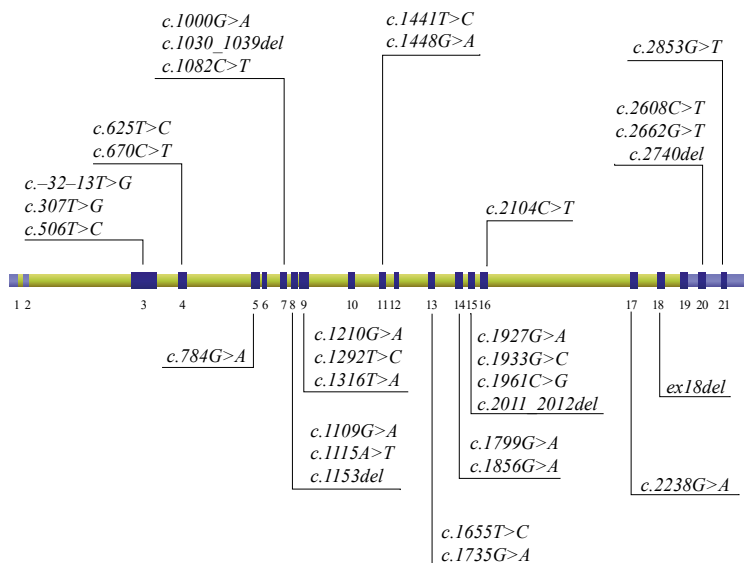


Рис. 68. Структура гена *GAA*(NM_001079803.2) и распределение мутаций, выявленных в ходе проведенного исследования

Согласно полученным данным, диагностика мажорных мутаций *c.-32-13T>G*, *c.2662G>T* и *c.307T>G* позволяет выявлять 35,2% патогенных вариантов гена *GAA*, при этом диагностика варианта *c.-32-13T>G* у пациентов с поздним началом БП позволяет выявлять 34,6% патогенных вариантов гена *GAA*.

Таким образом, можно рекомендовать следующий алгоритм генетической диагностики БП у российских пациентов:

- 1) измерение активности кислой α -1,4-глюкозидазы 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 невыявления этих патогенных биаллельных вариантов – поиск мутаций во всех кодирующих и прилегающих интронных областях гена *GAA*;
- 4) в случае невыявления биаллельных патогенных вариантов гена *GAA* – поиск протяженных делеций и дупликаций методом МЛРА.

1.3.2.6. Выводы

Разработанный метод диагностики БП позволил провести селективный скрининг 2978 пациентов с подозрением на БП, выявить 19 (0,64%) 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, вычислив достоверные корреляции позднего возраста манифестации и диагностики БП у пациентов с интронной мутацией *c.-32-13T>G* и описав 9 вариантов гена *GAA*, не описанных в базе HGMD ранее.



ГЛАВА 2

НЕСОВЕРШЕННЫЙ ОСТЕОГЕНЕЗ

Несовершенный остеогенез (НО) – это группа редких клинически и генетически гетерогенных болезней соединительной ткани, проявляющихся ломкостью костей, деформацией скелета, аномалией дентина, голубыми склерами, потерей слуха, снижением легочной функции и регургитацией сердечных клапанов [966]. Состояние было описано еще в древней истории и обнаружено у египетской мумии, датируемой 1000 лет до н.э., однако термин «несовершенный остеогенез» вступил в употребление лишь в 1895 году [191, 511].

Основу текущей номенклатуры НО предложил Силленс в 1979 году, выделив и описав фенотип четырех типов НО [876]. Она и по сей день широко используется в качестве критериев Силленса и постоянно пополняется новыми формами НО, обладающими клиническим, рентгенологическим и гистологическим разнообразием, в связи с различной молекулярной основой их патогенеза [1007]. Последнее, девятое по счету издание, включающее общую классификацию генетически обусловленных болезней соединительной ткани, содержит



меньшее число расстройств, по сравнению с предыдущим (436), и значительно большее число генов (364), что обеспечивает скачок высокотехнологичных методов диагностики генетических болезней, в связи с широким распространением технологии высокопроизводительного секвенирования [165]. В рамках этой классификации НО подразделяется на 5 различных типов в зависимости от клинических проявлений и тяжести течения болезни: недеформирующая легкая форма с единичными переломами костей, гипермобильностью суставов и голубыми склерами, вызываемая мутациями в генах *COL1A1* и *COL1A2* (НО, тип I); перинатально-летальная, самая тяжелая форма, вызываемая мутациями в генах *COL1A1* и *COL1A2*, *CRTAP*, *P3H1*, *PP1B* (НО, тип II); прогрессирующая деформирующая форма с множественными переломами и деформациями верхних и нижних конечностей, гипермобильностью суставов, нарушением изгиба позвоночника, отставанием в физическом развитии, низкорослостью и остеопорозом, вызываемая мутациями в генах *COL1A1* и *COL1A2*, *CRTAP*, *P3H1*, *PP1B*, *SERINH1*, *FKBP10*, *PLOD2*, *SERPINF1*, *SP7*, *WNT1*, *TMEM38B*, *CREB3L1*, *SEC240* (НО, тип III); умеренная форма с переломами костей, гипермобильностью суставов, нарушением изгиба позвоночника и остеопенией, вызываемая мутациями в генах *COL1A1* и *COL1A2*, *CRTAP*, *PP1B*, *FKBP10*, *SERPINF1*, *WNT1*, *SP7* (НО, тип IV) и НО, тип V с оссификацией бескостной мембраны предплечья и/или гиперпластическими костными мозолями, причиной развития которого являются мутации гена *IFITM5* (табл. 45).

В общей сложности приблизительная распространенность всех форм НО составляет 1 случай на 15 000–20 000 живых новорожденных, при этом НО, тип I и IV считаются наиболее частыми, встречаясь в среднем в 4 случаях из 100 000 живых новорожденных [341]. В Соединенных Штатах заболеваемость НО оценивается в 1 случай на 20 000 живых новорожденных, а количество больных составляет от 20 000 до 50 000 человек [819]. Частота НО примерно одинакова для всех популяционных групп, однако в популяциях Шона и Ндебеле, проживающих в Зимбабве, гораздо чаще встречается НО, тип III относительно НО, тип I. Аналогичная картина была обнаружена в сегментах нигерийского и южноафриканского населения [987]. Тем не менее, общее число всех типов НО в этих регионах остается примерно таким же, как и в любой другой этнической группе.

Таблица 45. Соответствие классификаций НО по клиническим и генетическим признакам

Название (тип), в соответствии с классификацией Бонафе [165]	Ген, OMIM	Локус, тип наследования
Недеформирующий (I)	<i>COL1A1</i> , 120150	17q21.33, АД
	<i>COL1A2</i> , 120160	7q21.3, АД
Перинатально-летальный (II)	<i>COL1A1</i> , 120150	17q21.33, АД
	<i>COL1A2</i> , 120160	7q21.3, АД
	<i>CRTAP</i> , 605497	3p22.3, AP
	<i>LEPRE1/P3H1</i> , 610339	1p34.2, AP
	<i>PPIB</i> , 123841	15q22.31, AP
Прогрессирующий деформирующий (III)	<i>COL1A1</i> , 120150	17q21.33, АД
	<i>COL1A2</i> , 120160	7q21.3, АД
	<i>SERPINF1</i> , 172860	17p13.3, AP
	<i>CRTAP</i> , 605497	3p22.3, AP
	<i>LEPRE1/P3H1</i> , 610339	1p34.2, AP
	<i>PPIB</i> , 123841	15q22.31, AP
	<i>SERPINH1</i> , 600943	11q13.5, AP
	<i>FKBP10</i> , 607063	17q21.2, AP
	<i>SP7</i> , 606633	12q13.13, AP
	<i>BMP1</i> , 112264	8p21.3, AP
	<i>TMEM38B</i> , 611236	9q31.2, AP
	<i>WNT1</i> , 164820	12q13.12, AP
	<i>CREB3L1</i> , 616215	11p11.2, AP
<i>SPARC</i> , 182120	5q33.1, AP	
Умеренный (IV)	<i>COL1A1</i> , 120150	17q21.33, АД
	<i>COL1A2</i> , 120160	7q21.3, АД
	<i>SERPINF1</i> , 172860	17p13.3, AP
	<i>CRTAP</i> , 605497	3p22.3, AP
	<i>PPIB</i> , 123841	15q22.31, AP
	<i>SERPINH1</i> , 600943	11q13.5, AP
	<i>FKBP10</i> , 607063	17q21.2, AP
	<i>SP7</i> , 606633	12q13.13, AP
<i>WNT1</i> , 164820	12q13.12, AP	
С оксификацией бескостной мембраны предплечья и/или гиперпластическими костными мозолями (V)	<i>IFITM5</i> , 614757	11p15.5, АД

Примечание. Гены *SPARC*, *TENT5A*, *MBTPS2*, *MESD* не включены в классификацию генетически обусловленных болезней соединительной ткани [165].



Белок	Тип, в соответствии с базой данных OMIM [738]
Коллаген α-1 I типа	I/II/III/IV
Коллаген α-2 I типа	II/III/IV
Коллаген α-1 I типа	I/II/III/IV
Коллаген α-2 I типа	II/III/IV
Хрящ-ассоциированный белок	VI
Лепрекан/Пролил-3-гидроксилаза 1	VIII
Пептидил-пролил-изомераза B	IX
Коллаген α-1 I типа	I/II/III/IV
Коллаген α-2 I типа	II/III/IV
Ингибитор сериновой пептидазы, класс F, 1	VI
Хрящ-ассоциированный белок	VII
Лепрекан/Пролил-3-гидроксилаза 1	VIII
Пептидил-пролил-изомераза B	IX
Коллаген-связывающий белок 2	X
FK506-связывающий белок 10	XI
Транскрипционный фактор Sp7	XII
Морфогенетический белок кости 1	XIII
Трансмембранный белок 38B	XIV
Белок Wnt1 протоонкогена	XV
Субстанция специфически продуцируемая старыми остеоцитами (OASIS)	XVI
Секретируемый белок, кислый, цистеин богатый	XVII
Коллаген α-1 I типа	I/II/III/IV
Коллаген α-2 I типа	II/III/IV
Ингибитор сериновой пептидазы, класс F, 1	VI
Хрящ-ассоциированный белок	VII
Пептидил-пролил-изомераза B	IX
Коллаген-связывающий белок 2	X
FK506-связывающий белок 10	XI
Транскрипционный фактор Sp7	XII
Белок Wnt1 протоонкогена	XV
Индуцированный интерфероном трансмембранный белок 5	V

В 85–90% случаев НО развивается вследствие гетерозиготных мутаций в генах *COL1A1* и *COL1A2*, которые кодируют α -1 и α -2 цепи коллагена I типа соответственно [628]. Коллаген I типа является основным структурным белком соединительной ткани и наиболее распространенным белком животного мира, формируя внеклеточный каркас костей, кожи и сухожилий. Он составляет приблизительно 30% массы тела человека и 90% белка костной ткани [819]. Коллаген I типа состоит из двух α -1 цепей и одной α -2 цепи, которые, переплетаясь, образуют жесткую тройную спираль. Каждая цепь содержит аминок- и карбокси-терминальные пропептиды, а также центральный домен, состоящий из 338 триплетных повторов Gly-XY в каждой из трех цепей, где XY представляют остатки любых аминокислот за исключением цистеина и триптофана, чаще всего являясь остатками пролина в X-положении и гидроксипролина, либо лизина – в Y-положении, обеспечивая стабильность тройной спирали [871]. Замена глицинового остатка, обладающего наименьшими среди всех аминокислотных остатков боковыми цепями и являющегося единственным остатком, который может занимать осевое положение в тройной спирали, на любой другой аминокислотный остаток неминуемо приводит к нарушению спиральной структуры коллагена [256]. Мутации в генах *COL1A1* и *COL1A2* изменяют структуру и/или количество коллагена I типа, что приводит к фенотипу НО, который варьирует от субклинического до летального [341]. Такие пациенты демонстрируют качественные и количественные аномалии коллагена I типа из-за доминирующего отрицательного эффекта гетерозиготных мутаций. Как правило, С-терминальные замены остатков глицина приводят к тяжелому фенотипу болезни, тогда как N-терминальные замены вызывают более мягкие клинические проявления [627]. Аминокислотные остатки α -1 цепей с большими боковыми и заряженными цепями оказывают наиболее серьезное разрушительное действие на тройную структуру, в независимости от места расположения нуклеотидного варианта внутри гена, являясь преимущественно летальными [627]. Замены в двух основных локусах связывания лигандов вблизи карбоксильного конца α -1 цепей имеют исключительно летальные исходы, указывая на важные взаимодействия между коллагеном и неколлагеновыми матриксными белками. При этом мутации тех же областей α -2 цепи в большинстве случаев не носят летального характера [627]. Менее 5% мутаций, вызывающих НО, встречаются в проколлагеновом С-пропептиде, приводя к ухудшению связей между цепями, либо к нарушению механизма сворачивания [744]. Структурные дефекты коллагена имеют более тяжелые последствия для внутриклеточного метаболизма и матричной структуры, чем

уменьшенное количество молекул коллагена без дефектов структуры. Гетерозиготные «нулевые» аллели гена *COL1A1* приводят к синтезу укороченного структурно нормального коллагена и вызывают мягкую форму болезни [1021], тогда как гетерозиготные «нулевые» аллели гена *COL1A2* могут и не иметь явных признаков НО [285], в то время как гомозиготные – обуславливают клиническую картину тяжелого НО либо мягкой формы синдрома Элерса–Данло, связанного с сердечными нарушениями [619]. Консорциум, созданный в 2007 году для изучения мутаций, вызывающих НО в коллагеновых генах I типа, к настоящему времени позволил собрать информацию по более чем 1400 различным мутациям, большинство которых составляют замены остатков глицина в кодируемых белках (638) и мутации сайтов сплайсинга (285) [463]. После секреции молекулы проколлагена подвергаются внеклеточному процессу созревания, в котором N-пропептиды и C-пропептиды удаляются специфическими протеазами. После такой обработки коллагеновые спирали способны спонтанно собираться в фибриллы в тканях для дальнейшей стабилизации при помощи сшивок. Сайт расщепления N-пропептида кодируется шестью экзонами обоих генов коллагена, а само расщепление проходит под действием металлофермента ADAMTS-2. При этом мутации, изменяющие сайты пропептидного расщепления, приводят к развитию особого фенотипа [618]. Так называемый скиппинг шестого экзона гена *COL1A1* на уровне РНК приводит к развитию синдрома Элерса–Данло, тип VIIA, тогда как скиппинг шестого экзона гена *COL1A2* вызывает синдром Элерса–Данло, тип VIIB. Синдром Элерса–Данло, тип VII характеризуется гиперэластичностью кожи с выраженным гипермобильным синдромом, врожденным двусторонним вывихом бедра, слабостью связочного аппарата, легкой остеопенией, которая может приводить к переломам у некоторых пациентов [200]. Другой причиной дефектного N-пропептидного процессинга являются мутации первых 85 остатков спиральной области обоих генов коллагена, вызывая развитие комплексного НО / синдрома Элерса–Данло. Мутации в этой области гена *COL1A1* ассоциируются с преобладанием симптомов НО умеренной и тяжелой степени, тогда как симптомы синдрома Элерса–Данло преобладают в случае мутаций гена *COL1A2*. Клинически пациенты с комбинированным НО / синдромом Элерса–Данло имеют выраженную гипермобильность крупных и мелких суставов, нарушение осанки, врожденные вывихи и подвывихи бедра, прогрессирующий сколиоз [204]. Третий тип дефектной обработки N-пропептидов имеет рецессивное наследование, вызванное мутациями гена, кодирующего ADAMTS-2 (синдром Элерса–Данло VIIC) и характеризуется более тяжелым течением. Аналогично, дефекты сборки C-пропептида

имеют доминантные мутации в местах расщепления и рецессивные мутации, приводящие к дефектам ферментативной обработки [913]. Парадоксальным выглядит тот факт, что совокупность этих дефектов приводит к НО с так называемой высокой костной массой [584]. Были описаны доминантные мутации аминокислотных остатков Ala и Asp в сайтах расщепления С-пропептида в генах *COL1A1* и *COL1A2*, приводя к включению рС-коллагена во внеклеточный матрикс и образованию коллагеновых волокон с нерегулярными поперечными сечениями [584, 766]. Дети предпубертатного возраста с мутациями р.Asp1219Asn гена *COL1A1* и р.Ala1119Thr гена *COL1A2* имеют мягкое течение НО с небольшим количеством переломов, нормальным ростом, нормальными склерами, здоровыми зубами и со значительно увеличенной минерализацией костной ткани по сравнению со стандартными значениями, характерными для НО [584].

За последние 10 лет открытие новых генов, связанных с НО, во многом прояснило патогенез развития болезни. Расширенная классификация, созданная на основе молекулярной этиологии НО, продемонстрировала весьма разнородные генетические причины развития болезни с различными механизмами наследования и широкой вариабельностью клинической картины (табл. 45) [165, 738].

В 2000 году коллектив ученых впервые описал 7 случаев НО, клинически похожих на НО, тип IV [390]. При этом ввиду нехарактерных гиперпластических костных мозолей и особых гистологических характеристик, отличающихся от первых четырех типов, а также ввиду отсутствия мутаций в генах *COL1A1* и *COL1A2*, описанные случаи было решено выделить в отдельный V тип НО (OMIM 610967).

Позднее гиперпластические костные мозоли с преимущественной локализацией в бедренных костях удалось обнаружить у 65% пациентов, что позволило считать их патогномичным симптомом НО, тип V [856]. Лишь в 2012 году удалось обнаружить генетическую этиологию этого типа НО в гене *IFITM5*, кодирующем индуцированный интерфероном трансмембранный белок 5, посредством полноэкзомного секвенирования двумя независимыми группами ученых [238, 856]. Этот белок участвует в формировании остеобластов [508] и в ранней минерализации костной ткани в эмбриональном периоде, однако ее механизм по-прежнему остается не до конца изученным [628].

В 2006 году впервые была описана гомозиготная мутация гена *CRTAP* как генетическая причина рецессивного НО [117]. С тех пор новые мутации, вызывающие рецессивные формы НО, были идентифицированы в генах *FKBP10*, *LEPRE1*, *PLOD2*, *PP1B*, *SERPINF1*, *SERPINH1*, *SP*, *BMP1* и *TMEM38B*. Каждый из них получил номер определенного типа НО в базе данных OMIM. НО, тип VI (OMIM



613982) является аутосомно-рецессивной формой НО, характеризуется дефектом минерализации костной ткани и обусловлен мутациями гена *SERPINF1*, расположенного в хромосомной области 17p13.3 [113]. Белок, кодируемый геном *SERPINF1*, ингибирует созревание остеокластов путем стимулирования экспрессии остеопротегерина [577]. Несмотря на то, что мутации в генах *IFITM5* и *SERPINF1* имеют противоположные эффекты на степень минерализации: с увеличенной оссификацией в случае мутаций гена *IFITM5* и с уменьшенной минерализацией в случае гена *SERPINF1*, их метаболические пути пересекаются, что позволяет предположить, что белки имеют функциональную связь. В частности, была описана гетерозиготная мутация p.Ser40Leu гена *IFITM5*, связывающая типы V и VI и вызывающая декомпрессионный деформирующий НО и гистологию, характерную для типа VI [326]. Согласно критериям Силленса, фенотип больных НО, тип VI схож с фенотипом больных НО, тип III или IV. Для этих пациентов характерна тяжелая прогрессирующая деформирующая дисплазия костей со значительно сниженной минеральной плотностью, частыми переломами и компрессией позвонков [236].

НО, тип VII (MIM 610682) является аутосомно-рецессивной формой НО, вызываемой мутациями в гене *CRTAP*, расположенном в хромосомной области 3p22 и кодирующем белок, участвующий в посттрансляционной модификации проколлагена I типа в эндоплазматическом ретикулуме. На его долю приходится 2–3% случаев летального НО [117]. Ранее этот тип НО был описан у 8 пациентов, тяжесть заболевания которых варьировала от средней до тяжелой степени, проявляясь ломкостью и деформациями костей, голубыми склерами и ризомелией, однако они не были подтверждены генетически [1005].

В 2007 году был описан еще один аутосомно-рецессивный тип НО, названный НО, тип VIII (OMIM 610915). Эта форма обуславливается мутациями в гене *LEPRE1*, расположенном в хромосомной области 1p34.2 и кодирующем лепрекан, который также участвует в посттрансляционной модификации проколлагена I типа в эндоплазматическом ретикулуме. Мутации этого гена ассоциированы с тяжелой или летальной формой НО [205], характеризующейся остеохондродистрофией, переломами в неонатальном периоде, широкими трубчатыми костями, нормальными склерами, ризомелией, низким ростом, резко сниженной минеральной плотностью костной ткани и деформацией метафизов по типу «луковицы» [23]. Нулевая мутация в генах *LEPRE1* либо *CRTAP* приводит к отсутствию обоих белков в мутантных клетках, поскольку эти белки взаимодополняют друг друга в комплексе гидроксирования коллагена, что связано со сходными клиническими проявлениями VII и VIII типов НО [203].

НО, тип IX (ОМIM 259440) является аутосомно-рецессивной формой НО, соответствующей клинически тяжелым типам II и III классификации Силленса и вызываемой мутациями гена *PP1B*, расположенного в хромосомной области 15q22.31 и кодирующего пептидил-пролил-изомеразу В, также участвующую в посттрансляционной модификации проколлагена I типа в комплексе с *LEPRE1* и *CRTAP* в эндоплазматическом ретикулуме [968]. К настоящему времени описаны всего лишь восемь случаев НО, тип IX, с нормальными склерами и длинными трубчатыми костями [488].

НО, тип X (ОМIM 613848) также является аутосомно-рецессивной формой НО и обусловлен мутациями гена *SERPINH1*, расположенного в хромосомной области 11q13.5. Эта форма НО характеризуется деформациями костей и множественными переломами, генерализованной остеопенией, несовершенным дентиногенезом и голубыми склерами. *SERPINH1* кодирует коллагенсвязывающий белок, который функционирует в эндоплазматическом ретикулуме и цитоплазме как шаперон, участвуя в корректном сворачивании тройной спирали коллагена I типа и в ее транспорте из эндоплазматического ретикулума в комплекс Гольджи [245].

НО, тип XI (ОМIM 610968) является аутосомно-рецессивной формой болезни, вызываемой мутациями гена *FKBP10*, расположенного в хромосомной области 17q21 и связанного с дефектом обработки молекулы коллагена I типа в эндоплазматическом ретикулуме перед ее транспортом в комплекс Гольджи [341]. Пациенты с НО, тип XI имеют тяжелые прогрессирующие деформации, переломы длинных трубчатых костей, контрактуры суставов, низкий рост, нормальные склеры и не имеют несовершенного дентиногенеза [116]. Кроме того, мутации *FKBP10* вызывают Брук синдром, тип I, НО с тяжелым течением, врожденными контрактурами крупных суставов, низким ростом, птеригией и сколиозом. НО, тип XII (ОМIM 613849) является аутосомно-рецессивной формой НО, которая ассоциирована с мутациями гена *SP7*, расположенного в хромосомной области 12q13.13. Клинически характеризуется периодическими переломами, деформациями костей, генерализованным остеопорозом, замедленным ростом зубов в отсутствие несовершенного дентиногенеза, нормальным слухом и белыми склерами [564].

НО, тип XIII (ОМIM 614856) был описан в 2012 году как НО с аутосомно-рецессивной формой наследования, обусловленный мутациями гена *VMP1*, кодирующего основной С-протеазный фермент VMP1/mTLD, расположенный в хромосомной области 8p21 и связанный с некорректным отщеплением С-концевых пептидов после транспорта проколлагена I типа в комплекс Гольджи и последующего экзоцитоза



во внеклеточный матрикс на последнем этапе образования коллагена I типа [637]. Мутации гена *BMPI* приводят к тяжелым проявлениям НО, поскольку этот фермент также обрабатывает другие проколлагены и активирует лизилоксидазу [637].

НО, тип XIV (OMIM 615066) был описан как аутосомно-рецессивная форма, характеризующаяся варьирующей степенью тяжести. В одном из трех описанных к настоящему времени случаев голубые склеры и умеренная потеря слуха, наряду с остеопенией и множественными переломами длинных трубчатых костей, как и в двух других, обуславливались рецессивными мутациями в гене *TMEM38B*, расположенном в хромосомной области 9q31 [866].

НО, тип XV (OMIM 615220) был описан вслед за идентификацией гомозиготных мутаций в гене *WNT1* [780]. Результат гипофункции *WNT1* преобразуется в фенотип с низкой массой костей у пациентов и характеризуется различной степенью тяжести от легкой до прогрессирующей деформирующей вплоть до ранней младенческой смерти. Кроме того, были идентифицированы семьи с ранним остеопорозом, наследующимся в соответствии с аутосомно-доминантной моделью наследования и гетерозиготными мутациями гена *WNT1* [515].

НО, тип XVI (OMIM 616229) вызывают биаллельные мутации гена *CREB3L1*, кодирующего эндоплазматический ретрансляционный транскрипционный белок OASIS, который регулирует экспрессию проколлагена I типа, а значит, можно предположить, что рецессивные мутации этого гена приводят к недостаточности проколлагена I типа. Сообщалось о нескольких случаях болезни, возникших в результате гомозиготных делеций гена *CREB3L1*, длиной около 91 т.п.н. Первым описанным пациентом был мальчик с множественными переломами, происходившими начиная с пренатального возраста. У него также было несколько приступов пневмонии, и он умер в возрасте 9 лет, предположительно от респираторных осложнений [877].

Рецессивные мутации гена *SPARC*, вызывающие НО, тип XVII (OMIM 616507), расположенного в хромосомной области 5q33.1, кодирующего гликопротеин, который связывается с многочисленными матричными белками, включая коллаген I типа, были описаны у двух неродственных пациентов с низкой минеральной плотностью костей, множественными переломами, гипермобильностью суставов, и имеющих при этом нормальный рост [661].

Гомозиготные мутации гена *TENT5A*, описанные в 2018 году как причина НО, тип XVIII (OMIM 617952) умершего в 4 года итальянского мальчика, родившегося с варусной деформацией бедренных костей и вальгусной деформацией голени и развернувшего в первые 2 года жизни клинику НО с четырьмя спонтанными переломами,

голубыми склерами и несовершенным дентиногенезом. Похожая клиника была описана у французских брата с сестрой, родившихся от родителей, приходящихся друг другу двоюродными братом и сестрой, и у египетской девочки, также родившейся от близкородственного брака. У последней в возрасте 5 лет был рецидив спонтанных переломов, число которых достигло 7 в течение одного года. Кроме того, у французских сибсов наблюдалась ЗПМР, тогда как у египетской девочки – ЗМР [294].

В 2016 году Линдерт с соавторами описали НО, тип XIX (OMIM 301014), вызванный мутациями в гене *MBTPS2* в тайской и немецкой семьях у мужчин, имеющих невысокий рост, множественные переломы ребер и трубчатых костей, возникающие пренатально, число которых уменьшалось после полового созревания, генерализованную остеопению и X-сцепленное рецессивное наследование [587].

Последним, XX типом НО (OMIM 618644), описанным к настоящему времени у 5 пробандов с мутациями гена *MESD*, родившихся от близкородственных родителей, был прогрессирующий деформирующий тип НО с пренатальными переломами, безуспешным лечением бисфосфонатами и глобальной задержкой умственного развития, отмеченной лишь у 3 пациентов [682].

Таким образом, гены, продукты которых принимают участие в биогенезе коллагена I типа, вызывая НО, можно распределить по пяти функциональным категориям следующим образом: первичные дефекты в структуре или функции коллагена (*COL1A1*, *COL1A2*, *BMP1*); дефекты модификации коллагена (*CRTAP*, *LEPRE1*, *PIIB*, *TMEM38B*); дефекты сворачивания коллагена и сшивки (*SERPINH1*, *FKBP10*, *PLOD2*); дефекты оксификации или минерализации (*IFITM5*, *SERPINF1*); дефекты развития остеобластов с коллагеновой недостаточностью (*WNT1*, *CREB3L1*, *SP7*) [342]. Кроме того, в 2013 году в пяти семьях с остеопорозом и переломами, манифестирующими в детском возрасте, были идентифицированы мутации гена *PLS3*, кодирующего пластин, участвующий в синтезе нитевидных актиновых пучков, необходимых для сохранения прочности костной ткани, и установлен X-сцепленный тип наследования [967].

Несмотря на генную вариабельность НО, продемонстрированную в последние годы, большинство специалистов продолжают категоризировать все наблюдаемые случаи НО в соответствии с классификацией Силленса, описывая новые типы НО как подтипы пяти групп, распределяя их в соответствии с наиболее подходящим фенотипом [1007]. Первичная диагностика НО, как и ранее, сводится к клинической и рентгенологической диагностике, которые позволяют выявить повреждения костей, возникшие вследствие легкой травмы, признаки генерализо-



ванной остеопении, дугообразные деформации костей конечностей, компрессию позвонков, узкую грудную клетку и недоразвитие ребер [24]. В частности, денситометрию, являющуюся рентгенологическим методом и характеризующуюся более низкой лучевой нагрузкой, используют в настоящее время как стандартный метод измерения плотности костной ткани. Мягкая форма НО может долгое время не диагностироваться, поскольку расценивается как своеобразная форма остеопороза у взрослых и как форма травмы, возникшей вследствие физического насилия у детей, что представляет определенные сложности для диагностики. Периферическая квантовая компьютерная томография помогает диагностировать такие случаи НО [338], а также спорные случаи НО, обнаруженные в результате молекулярно-генетического анализа с неочевидной клинической значимостью найденных генетических вариантов, либо случаи генетического мозаицизма, выявляя значительно меньшую плотность костной ткани по меньшей мере одной кости скелета [344]. Гистоморфометрия, наряду с генетическими дефектами генов *COL1A1* и *COL1A2*, обнаруживала низкую плотность и трабекулярность костей у пациентов с I–IV типами НО [793] и была незаменима для диагностики пациентов с V и VI типами НО [389, 390] до первого обнаружения генетической этиологии в генах *IFITM5* и *CRTAP*. В настоящее время этот инвазивный метод диагностики заменен молекулярно-генетическими исследованиями для всех типов НО, причем эти исследования не всегда прекращают при выявлении одной мутации. Все чаще в научной литературе встречаются случаи, описывающие значимость нескольких мутаций в различных генах, вносящих вклад в клиническую картину болезни пациента [342]. Молекулярный диагноз также очень полезен для прогноза развития болезни, ответа на терапию, а также для планирования беременности и пренатальной диагностики.

Для лечения пациентов с НО наилучшим образом подходит мультидисциплинарный подход. Большинству больных для ведения самостоятельной жизни необходимы физическая реабилитация, физиотерапия и гидротерапия. Нарушение функции легких является основной причиной частых болезней и смертности при НО [879]. Терапия бисфосфонатами – лечение, направленное на снижение активности остеокластов, проводится у большинства детей с НО. Будучи синтетическими аналогами пирофосфатов, они оседают на поверхности кости, где посредством механизма эндоцитоза индуцируется программируемая гибель зрелых остеокластов, приводя к увеличению объема костей посредством уменьшения остеолитической активности. Бисфосфонаты имеют десятилетний период полувыведения из кости, а эффект от их приема сохраняется в течение многих лет после прекращения лечения.

В связи с этим циклическое лечение внутривенными бисфосфонатами стало золотым стандартом для лечения детей с умеренным и тяжелым типом НО. Недавнее рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование перорального ризедроната у детей с НО продемонстрировало значительное снижение риска переломов [155]. В другом исследовании сообщалось, что максимальная плотность костной ткани достигается через 2–3 года после начала лечения (Letochaetal., 2005). Размещение интрамедуллярного телескопического стержня Фассиера–Дюваля в длинной кости, считающееся минимально инвазивным и не требующее артротомии, позволяет стабилизировать тяжелый перелом и обеспечивает быструю реабилитацию после коррекции деформации кости [817].

Все обнаруженные к настоящему времени этиологические механизмы развития НО так или иначе сводятся к нарушению функции коллагена, что напрямую связано с нарушением структуры, синтезом, посттрансляционной модификацией, сшивкой, а также дальнейшей минерализацией и дифференцировкой остеобластов, поэтому, ввиду слабой изученности генетических причин развития НО среди детского населения РФ, было решено разработать алгоритм молекулярно-генетической диагностики НО с применением технологии высокопроизводительного секвенирования для определения относительных частот и спектра патогенных вариантов генома, а также их корреляций с определенным фенотипом в целях изучения механизмов развития НО, свойственных популяциям, населяющим территорию современной России и персонификации терапевтических подходов. Полноэкзомное секвенирование, как и 5 лет назад, считается самым надежным способом поиска генетических причин развития новых форм НО, в случае отсутствия мутаций в таргетных областях генома, описанных выше. Доступность такого исследования на фоне прогресса знаний костного метаболизма гарантирует скорую перспективу выявления всех оставшихся причин НО и открывает эру новых терапевтических средств для лечения НО.

2.1. СЕЛЕКТИВНЫЙ СКРИНИНГ НЕСОВЕРШЕННОГО ОСТЕОГЕНЕЗА У РОССИЙСКИХ ПАЦИЕНТОВ

В 2014 году впервые в России нами была разработана тест-система для молекулярно-генетической диагностики НО на основе технологии высокопроизводительного секвенирования. Сложность

постановки точного клинического диагноза заключается в значительном полиморфизме фенотипических проявлений различных типов НО и их взаимном перекрывании, тогда как сложность молекулярно-генетической диагностики заключается в большой протяженности генов *COL1A1* и *COL1A2*, мутации которых являются первопричиной развития подавляющего большинства случаев этих заболеваний, а также в значительном числе генов, мутации которых вызывают оставшиеся случаи НО. Поэтому молекулярную диагностику НО, тип I–XX было решено проводить методом высокопроизводительного секвенирования, для чего была разработана библиотека гибридизационных зондов, покрывающая кодирующие и прилегающие интронные области генов *COL1A1*, *COL1A2*, *IFITM5*, *CRTAP*, *LEPRE1*, *P3H1*, *PPIB*, *SERPINF1*, *CRTAP*, *SERPINH1*, *FKBP10*, *SP7*, *VMP1*, *TMEM38B*, *WNT1*, *CREB3L1*, *SPARC*, которая позднее пополнилась таргетными областями генов *TENT5A*, *MBTPS2* и *MESD*, общей протяженностью около 210 т.п.н. Благодаря разработанной методике удалось проанализировать таргетные последовательности этих генов у 70 пациентов с подозрением на НО, в результате чего патогенные варианты генома были выявлены у 69 (98,6%) больных детей, что доказало 100%-ную эффективность разработанного метода генетической диагностики НО посредством технологии секвенирования нового поколения, так как переломы ребенка с подозрением на НО и отсутствием мутаций в анализируемых таргетных областях генома были вызваны остеопетрозом, который был подтвержден при помощи полноэкзомного секвенирования.

2.2. КЛИНИЧЕСКИЕ, ГЕОГРАФИЧЕСКИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ НЕСОВЕРШЕННОГО ОСТЕОГЕНЕЗА

Молекулярно-генетическая диагностика НО была проведена 41 (59%) мальчику и 28 (41%) девочкам в возрасте от 1 месяца до 17 лет и 5 месяцев, при этом средний возраст выборки на момент проведения исследования составил 7 лет, медиана – 5 лет. Средний возраст манифестации клинических симптомов составил 1 год и 3 месяца, медиана – 8 месяцев. Наименьшим возрастом манифестации отличались дети с НО III типа: медиана – с рождения (1–2 дня) ($p < 0,001$), наибольшим – с НО I типа: медиана – 30 месяцев (12–36 месяцев) ($p < 0,001$).

Географические особенности НО были установлены для 63 (91,3%) обследованных пациентов из 58 (93,8%) семей (табл. 46).

Таблица 46. Распределение обследованных нами пациентов с НО в различных субъектах РФ

Субъект	Численность населения	Число семей	Число случаев	Частота в субъекте*
Москва	12 615 882	15	15	1:841 059
Московская область	7 599 756	10	12	1:633 313
Саратовская область	2 440 729	3	3	1:813 576
Самарская область	3 183 038	3	3	1:1 061 013
Республика Северная Осетия	699 312	2	3	1:233 104
Республика Дагестан	3 085 738	2	3	1:1 028 579
Красноярский край	2 874 050	2	2	1:958 017
Архангельская область	1 144 119	2	2	1:572 060
Забайкальский край	1 065 785	2	2	1:532 893
Кемеровская область	2 674 283	2	2	1:1 337 142
Челябинская область	3 475 727	2	2	1:1 737 864
Ямало-Ненецкий АО	541 479	1	2	1:270 740
Алтайский край	2 332 511	1	1	1:2 332 511
Республика Бурятия	983 276	1	1	1:983 276
Воронежская область	2 327 843	1	1	1:2 327 843
Ивановская область	1 004 192	1	1	1:1 004 192
Камчатский край	314 722	1	1	1:314 722
Сахалинская область	489 638	1	1	1:489 638
Нижегородская область	3 214 657	1	1	1:3 214 657
Ростовская область	4 202 337	1	1	1:4 202 337
Тверская область	1 269 650	1	1	1:1 269 650
Оренбургская область	1 963 007	1	1	1:1 963 007
Краснодарский край	5 648 254	1	1	1:5 648 254

Примечание. *На основе выборки пациентов, обследованных в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

Все выявленные случаи НО, для которых были установлены географические особенности, распределились по 23 (26,7%) субъектам РФ с преобладанием в Москве (15/24,2%) и Московской области (12/19,4%). В Саратовской и Самарской областях, республиках Северная Осетия – Алания и Дагестан проживают по 3 (4,8%) обследованных пациента из трех (5%) семей. В Красноярском крае и Забайкальском крае, Архангельской, Кемеровской и Челябинской областях, а также в Ямало-Ненецком автономном округе нами зарегистрированы по 2 (3,2%) случая НО, при этом в последнем случае дети были из одной семьи. В остальных 11 субъектах России проживают по одному ребенку с НО, подтвержденным молекулярно-генетическими методами из числа обследованных нами детей. Значительный процент случаев в Москве и Московской области может указывать как на высокую численность населения, так и на преимущественную госпитализацию детей с подозрением на НО в наш Центр именно из этих регионов.

При анализе имеющихся географических данных обследованных нами пациентов на уровне федеральных округов выясняется, что около половины всех обследованных пациентов с НО проживают в Центральном федеральном округе (30/48,4%). В Приволжском федеральном округе зарегистрированы восемь детей из восьми семей с НО, составляя 12,9% обследованных пациентов. В каждом из остальных федеральных округов проживают менее 10% детей из обследованной нами когорты пациентов с НО (табл. 47).

Таблица 47. Распределение исследованных пациентов с НО в различных федеральных округах России

Федеральный округ	Численность населения	Число семей	Число пациентов	Частота, %	Частота в округе*
Центральный	39 378 947	28	30	48,4	1:1 312 632
Приволжский	29 397 227	8	8	12,9	1:3 674 653
Сибирский	17 173 185	6	6	9,7	1:2 862 198
Северо-Кавказский	9 866 370	4	6	9,7	1:1 644 395
Дальневосточный	8 188 594	5	5	8,1	1:1 637 719
Уральский	12 350 131	3	4	6,5	1:3 087 533
Северо-Западный	13 972 061	2	2	3,2	1:6 986 031
Южный	16 454 580	1	1	1,6	1:16 454 580

Примечание. * На основе выборки пациентов, обследованных в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России».

Частоты встречаемости различных клинических проявлений НО на момент проведения исследования удалось оценить у 66 (95,7%) обследованных пациентов, по девяти различным параметрам (рис. 69).

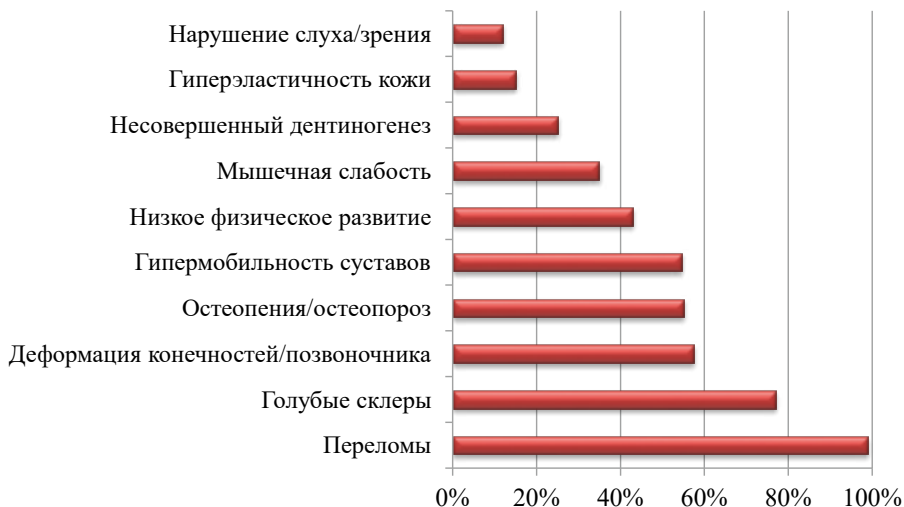


Рис. 69. Частоты различных клинических проявлений НО среди обследованных пациентов на момент первой госпитализации после постановки диагноза

У подавляющего большинства обследованных детей (98,5%) были выявлены переломы, что немного отличается от похожих исследований, проведенных за рубежом. В частности, в исследовании 76 бразильцев с НО у 8% детей не было зафиксировано ни одного перелома на момент постановки диагноза [182]. У 77,2% пациентов были обнаружены голубые склеры, что практически совпадает с исследованием Гриили с коллегами, обнаружившими голубые склеры у 75% из 68 обследованных детей [399]. Синие склеры описываются и у здоровых детей, и при других синдромах, включая синдромы Лойса–Дитца, Де Барси, Маршалла–Смита, Элерса–Данло, Рассела–Сильвера и синдром хрупкой роговицы, а также у детей с алкаптонурией [72, 295, 421, 530, 541, 635, 750, 1037, 1041]. У 58,2% обследованных детей – деформация конечностей/позвоночника, у 55,2% – остеопения/остеопороз, у 54,6% – гипермобильность суставов, низкое физическое развитие и мышечная слабость были выявлены в 43,3% и 35,3% соответственно. Несовершенный дентиногенез встретился у 24,6% детей. Хотя приблизительно 50% детей и взрослых с НО могут иметь поражение зубов, несовершенный дентиногенез также не является патогномоничным признаком этого расстройства [69, 1017]. Гиперэластичность кожи встретилась у 15,1%

и нарушение слуха/зрения – лишь у девятой части пациентов. Фенотип обследованных нами детей по большей части совпадал с фенотипом пациентов с НО, описанным зарубежными исследователями [182, 399].

Постановка клинического диагноза с учетом результатов проведенного молекулярно-генетического исследования позволила впервые описать относительные частоты различных типов НО у 69 российских детей (рис. 70).

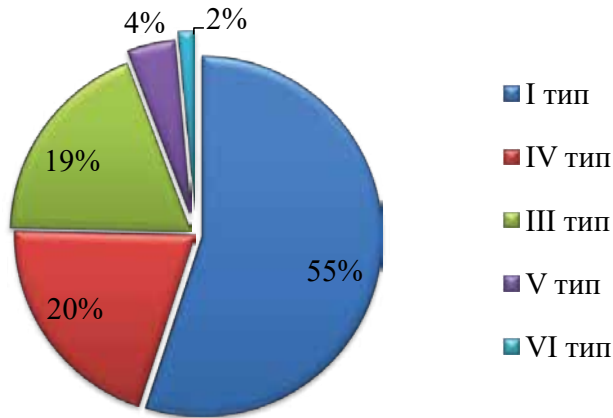


Рис. 70. Относительные частоты различных типов НО у обследованных российских детей

Из рис. 70 очевидно, что наиболее распространенным типом НО, обнаруженным у 38 (55%) обследованных детей, является НО, тип I. Вторым по частоте является НО, тип IV, обнаруженный у 14 (20%) обследованных пациентов. НО, тип III был выявлен у 13 (19%) обследованных детей. НО, тип V был выставлен 3 (4%) детям, а НО, тип VI – лишь одному ребенку из обследованной когорты российских пациентов (см. рис. 70). В настоящее время в мировой литературе описаны исследования больших когорт пациентов с различными типами НО, подтвержденными молекулярно-генетически, в которых были получены схожие данные, описывающие преимущественную встречаемость НО I типа [585].

Анализ генетических особенностей развития НО среди обследованных нами детей позволил описать распределение мутаций четырех генов у 69 детей с НО из 65 семей (рис. 71). 65 (95%) обследованных детей имели мутации в генах, кодирующих $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -цепи молекулы коллагена 1, что совпадает с преимущественным распределением мутаций именно в этих генах в большинстве изученных популяций [867, 903, 1055]. Необходимо отметить, что редкие, а также новые вари-

анты были обнаружены и в других генах, однако их гетерозиготность при описанном рецессивном типе наследования, а также анализ клинической картины болезни не позволил считать эти варианты этиологическими причинами развития болезни.

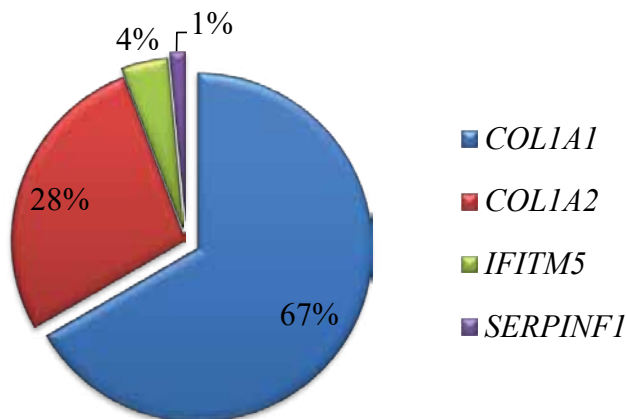


Рис. 71. Относительные частоты и спектр генов, содержащих мутации, у 69 обследованных российских детей с НО

Наибольшая частота и разнообразие выявленных генетических вариантов было отмечено для гена *COL1A1*, мутации которого вызвали НО I, III и IV типов у 46 (66,7%) пациентов из 41 семьи (63,1%) (см. рис. 71). Среди 35 (62,5%) различных выявленных вариантов 16 (45,7%) оказались не описанными ранее в базе данных HGMD. Это 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 мута-

ций 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 по сравнению со стандартными значениями, характерными для НО [584]. Для варианта *c.4328C>T, p.A1443V* была также установлена передача мутантного аллеля от отца с НО, тип I, при этом ребенку был выставлен диагноз НО, тип IV. Доминантные мутации в сайтах расщепления С-пропептида в генах *COL1A1* и *COL1A2*, подчеркивающие значимость С-пропептидов в молекулярной сборке и приводящие к включению рС-коллагена во внеклеточный матрикс и образованию коллагеновых волокон с нерегулярными поперечными сечениями, были описаны и ранее [584, 766]. Дупликация *c.1551_1554dup, p.P519Wfs*20*, сплайсинговые варианты *c.642+1G>C, c.3815-1G>A* и миссенс-варианты *c.617G>A, p.G206D, c.977G>T, p.G326V, c.1040G>A, p.G347D* и *c.2272G>A, p.G758S* не были обнаружены в геноме родителей, при этом детям с дупликацией и сплайсинговым вариантом *c.3815-1G>A* был выставлен диагноз НО, тип I, тогда как детям с миссенс-вариантами *c.1040G>A, p.G347D* и *c.2272G>A, p.G758S* и сплайсинговым вариантом *c.642+1G>C*, обладающим тяжелыми клиническими проявлениями болезни, включающими множественные переломы, укорочения и деформации костей, несовершенный дентиногенез и выраженный остеопороз, был выставлен диагноз НО, тип III, а детям с миссенс-вариантами *c.617G>A, p.G206D, c.977G>T, p.G326V* – НО, тип IV. Замена глицинового остатка, обладающего наименьшими среди всех аминокислотных остатков боковыми цепями и являющегося единственным остатком, который может занимать осевое положение в тройной спирали, на любой другой аминокислотный остаток неминуемо приводит к нарушению спиральной структуры коллагена [256], зачастую вызывая тяжелый фенотип болезни. Сплайсинговый вариант *c.2128-2A>C* был унаследован по материнской линии и обусловил клинические проявления НО, характерные для I типа. Ребенку с неопи-санной дупликацией *c.494dup, p.Y165**, сегрегацию которой не удалось проследить ввиду отсутствия биологического материала от родителей ребенка, был выставлен НО I типа (табл. 47).

Нонсенс-мутация *c.1243C>T, p.R415** была выявлена у трех детей из двух неродственных семей. Всем пациентам с этой мутацией был выставлен НО, тип I, что совпадало с более ранним ее описанием в научной литературе [456]. Миссенс-мутация *c.1678G>A, p.G560S* встретилась у двух детей, не состоящих в родстве, из Самарской области, одному из которых был выставлен диагноз НО, тип I, а другому – НО, тип IV, что также совпадало с ее более ранним описанием [627]. Сплайсинговая мутация *c.859-1G>A* была выявлена у двух

братьев с НО, тип I из семьи, проживающей в Ямало-Ненецком автономном округе. Нонсенс-мутация *c.3421C>T*, *p.R1141** была обнаружена у трех неродственных пациентов с НО, тип I из разных регионов РФ. Остальные мутации были обнаружены в единичных семьях (рис. 72). Среди них выделяется сплайсинговый вариант *c.751-2A>T*, обнаруженный нами в гомозиготном состоянии, не описанный ранее, однако описан нуклеотидный вариант *c.751-2A>G* у пациентов с мягким фенотипом НО, тип I [840]. В мировой литературе и ранее были описаны редкие случаи рецессивных мутаций генов *COL1A1* и *COL1A2* [443], и даже случай двух гетерозиготных замен глициновых остатков [915].

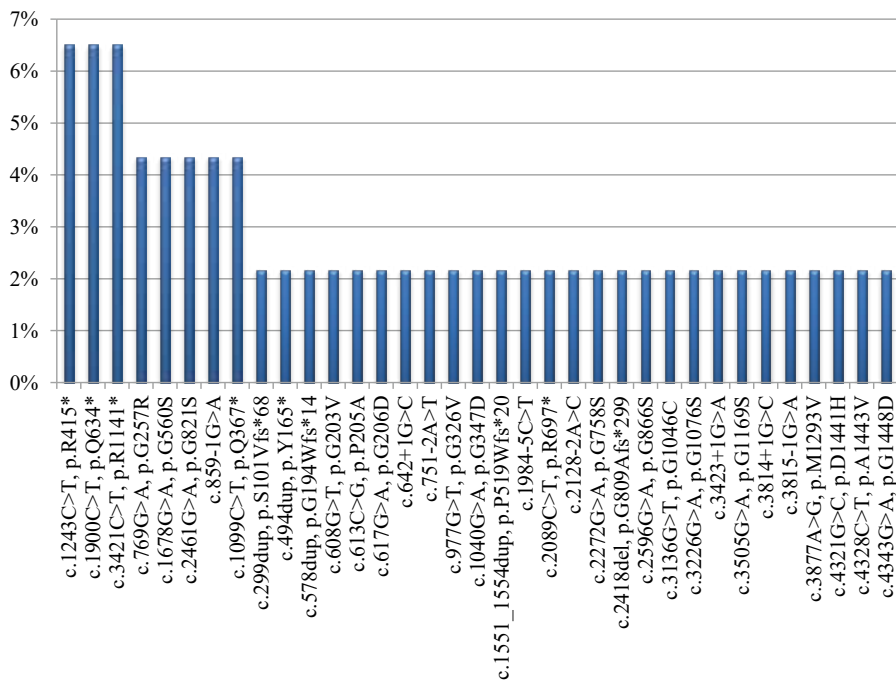


Рис. 72. Относительные частоты и спектр выявленных вариантов гена *COL1A1* у российских детей с НО

Анализ расположения обнаруженных мутаций *COL1A1*, отраженных на карте гена (рис. 73), позволил определить мутации N- и C-концевых доменов, кодирующих N- и C-пропептиды, и центрального домена, кодирующего спиральную структуру экспрессируемого белка, а также горячие области, включающие экзоны 3, 6, 9, 11, 16, 19, 24, 25, 28,32, 33, 35, 43, 44, 46, 47, 49, 51 и интроны 9, 10, 12,29, 46, 48, 49. При этом наибольшее число мутаций было выявлено в экзоне 9, однако сумма их долей, составляющая менее 10% от общего числа

выявленных вариантов, не позволяет провести оптимизацию разработанного нами алгоритма молекулярно-генетической диагностики НО в РФ.

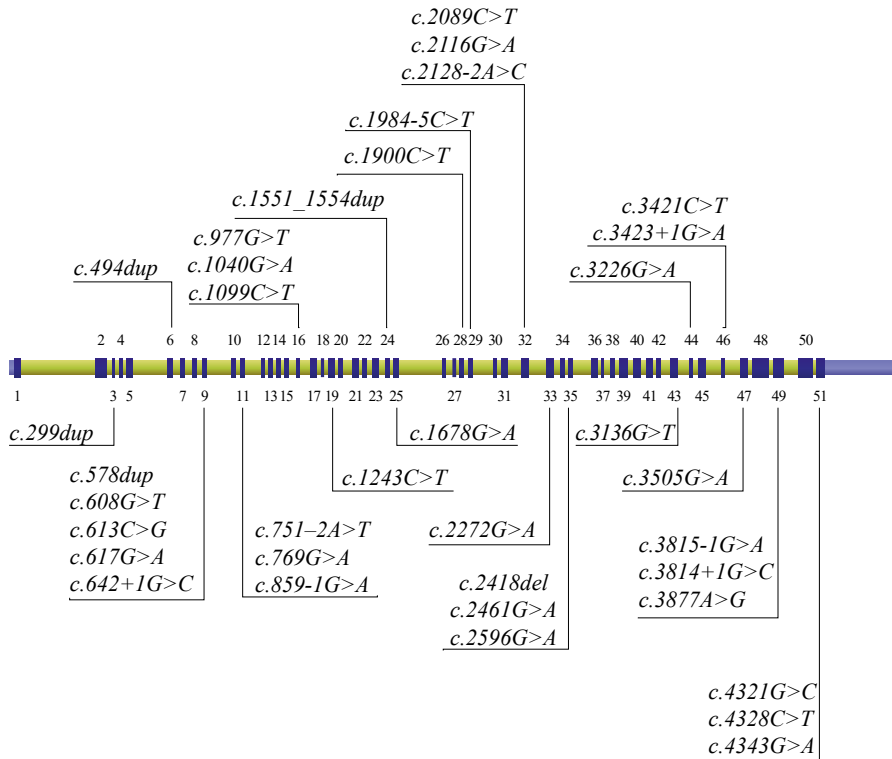


Рис. 73. Распределение выявленных мутаций на карте гена *COL1A1* (NM_000088.3)

Вторыми по относительной частоте среди всех типов НО оказались мутации гена *COL1A2*, обусловившие НО, тип I, III и IV у 19 пациентов (27,5%) из 19 семей (29,2%) (рис. 74). Среди 17 (30,4%) различных мутаций, четыре варианта (23,5%) не были описаны в базе HGMD ранее. 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 (табл. 47).

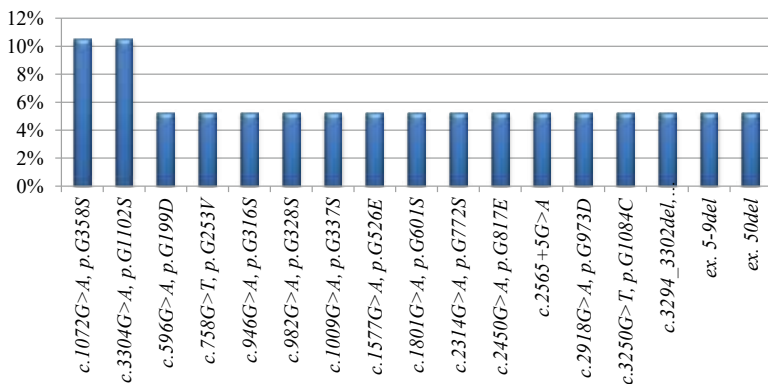


Рис. 74. Относительные частоты и спектр выявленных мутаций гена *COL1A2* у российских детей с НО

Миссенс-мутация *c.1072G>A, p.G358S*, описанная ранее у пациентов с НО, тип III и IV [627], была обнаружена нами у двух неродственных пациентов из Архангельской и Челябинской областей с тяжелым течением НО, тип III. Другая миссенс-мутация *c.3304G>A, p.G1102S*, описанная ранее у пациентов с НО, тип I [422], была выявлена у двух неродственных пациентов с НО, тип I, также проживающих в различных субъектах РФ. Остальные мутации встретились в единичных случаях (см. рис. 74).

Анализ расположения обнаруженных мутаций гена *COL1A2* на карте гена (рис. 75) позволил определить мутации центрального домена, кодирующего спиральную структуру экспрессируемого белка, а также мутации С-концевого пропептида. При этом лишь в экзоне 48 было обнаружено три мутации, а в экзонах 19, 21 и 40, включая интрон 40, – по две мутации, тогда как в остальных экзонах (13, 16, 26, 31, 38, 40, 46 и 50) было выявлено по одному патогенному варианту, что, как и в случае с геном *COL1A1*, не позволяет оптимизировать разработанный нами алгоритм молекулярно-генетической диагностики НО в РФ.

На третьем месте по относительной частоте среди всех типов НО оказались мутации гена *IFITM5*, вызвавшие НО, тип V у трех (4,4%) детей. Мутация *c.-14C>T*, расположенная в промотерной области гена, являющаяся мажорной мутацией для пациентов с НО, тип V, была выявлена нами у двух обследованных детей из Москвы и Челябинской области с гиперпластическими костными мозолями. Именно этот фенотипический признак, являющийся характерным для пациентов с НО, тип V [238], не был обнаружен у третьего

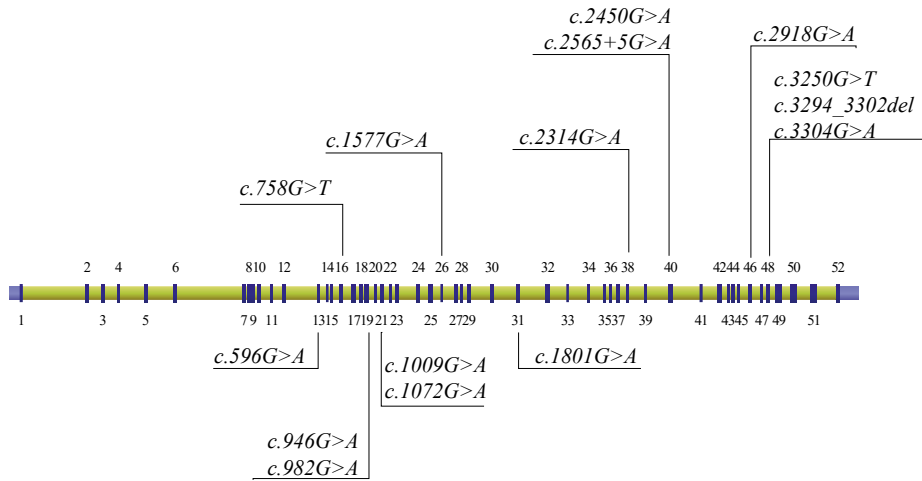


Рис. 75. Распределение выявленных мутаций на карте гена COL1A2 (NM_000089.3)

пациента с мутацией *c.306del*, приводящей к сдвигу рамки считывания *p.L103Wfs*3* (PVS1, PM2, PP1, PP4), не описанной ранее. Вероятно, обнаруженная нами делеция, обусловившая фенотип ребенка, отличный от фенотипа детей с НО, тип V, описанного другими учеными, связана с тем, что именно мутация *c.-14C>T* может обуславливать развитие гиперпластических мозолей. Это предположение подтверждается данными международной базы данных HGMD, в которой существует описание лишь трех патогенных вариантов гена *IFITM5*. Эти три случая наряду с биаллельными мутациями гена *SERPINF1*, выявленными у пациента, болезнь которого манифестировала в возрасте одного года, а точный диагноз удалось поставить лишь в возрасте 17 лет и 4 месяцев, являются первыми описаниями НО, тип V и тип VI в России соответственно [22, 66]. Как вероятно патогенный миссенс-вариант *c.185G>T*, приводящий к замене аминокислотных остатков *p.G62V* (PM2, PM5, PP3, PP4, PP5), так и патогенная вставка двух нуклеотидов *c.992_993insCA*, вызывающая сдвиг рамки считывания *p.E331Dfs*3* (PVS1, PM2, PP4, PP5), не были описаны в базе данных HGMD ранее.

Суммарно удалось выявить 56 этиологических вариантов в четырех различных исследованных генах. Среди них более половины – 31 (55,4%) составили миссенс-мутации, кроме того, были выявлены 9 (16,1%) мутаций сайтов сплайсинга, 5 (8,9%) различных нонсенс-мутаций, 5 (8,9%) вставок, 5 (8,9%) делеций, в том числе две протяженные, и одна (1,8%) регуляторная мутация (рис. 76).

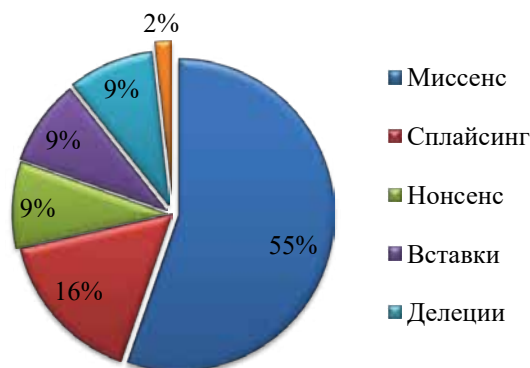


Рис. 76. Доли различных типов мутаций у 69 российских детей с НО

2.3. ГЕНОТИП-ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ КОРРЕЛЯЦИИ

В нашем исследовании НО, тип I достоверно ($p=0,002$) чаще вызывался «количественными» мутациями гена *COL1A1*, приводящими к укороченным белковым продуктам. При этом шансы развития НО, тип I у пациентов, обладающих такими мутациями, более чем в 7 раз превышали шансы развития НО, тип III и IV: ОШ=7,2 (ДИ 2,3–22,8) (табл. 48).

Таблица 48. Расчет ассоциации мутаций генов *COL1A1* и *COL1A2*, укорачивающих экспрессируемый белок, с типом НО у российских детей

	Число пациентов с НО		р-значение (критерий Фишера)	р-значение (поправка Бонферрони)
	тип I	тип III и IV		
<i>Есть</i>	16	3	<0,001	0,002
<i>Нет</i>	22	24		

НО, тип III и НО, тип IV в основном были вызваны миссенс- мутациями генов *COL1A1* и *COL1A2*, нарушающими трехмерную структуру кодируемых белков, в том числе в 74,1% (20/27) случаев миссенс-мутациями, расположенными в центральных доменах обоих генов, кодирующих тройную коллагеновую спираль и приводящих к заменам глициновых остатков на остатки серина, цистеина, валина, аспарагиновой

и глутаминовой кислот, предотвращая образование межцепочечной водородной связи между NH-группой глицина и CO-группой в X-положении соседней цепи, что поддерживало гипотезу, высказанную ранее [627, 1055] (табл. 49).

Таблица 49. Расчет ассоциации мутаций остатков глицина, расположенных в центральном домене гена COL1A1, с типом НО у российских детей

Мутация остатков глицина	Число пациентов с НО		р-значение (критерий Фишера)	р-значение (поправка Бонферрони)
	тип III, тип IV	тип I		
<i>Есть</i>	13	3	<0,001	<0,001
<i>Нет</i>	5	24		

При этом у 66,7% (6/9) пациентов с НО, тип III, у 54,6% (6/11) пациентов с НО, тип IV и у 45,5% (5/11) пациентов с НО, тип I остаток глицина менялся на остаток серина, в двух случаях – на остаток цистеина (НО, тип III и тип I), еще в трех случаях – на остаток валина (по одному случаю у пациентов с НО, тип I, тип III и тип IV), что приближается к данным, полученным при изучении китайской, вьетнамской и эстонской популяций [443, 1055, 1059]. При изучении польской популяции ученые отмечали преимущественное замещение остатков глицина остатками цистеина [106], что не находило подтверждения в наших данных. А у 40% тайваньских пациентов с НО аспарагиновая кислота замещала глицин [581], тогда как частота замен остатков глицина на аспарагиновую кислоту среди российских пациентов с НО, тип I, тип III и тип IV составила лишь 16% (5/31). Причина преимущественного замещения остатков глицина теми или иными аминокислотными остатками в разных географических регионах, по всей видимости, объясняется межпопуляционными различиями.

Особое внимание следует уделить миссенс-мутациям, приводящим к замене остатков глицина на остатки любой другой аминокислоты в генах COL1A1 и COL1A2. Для проверки гипотезы о связи тяжести течения НО с наличием таких мутаций был проведен расчет корреляции возраста манифестации НО у детей с рождения по сравнению с манифестацией болезни в любом другом возрасте. При сравнении группы пациентов с мутациями остатков глицина в генах COL1A1 и COL1A2 с пациентами, имеющими любые другие мутации этих же генов, была получена достоверная корреляция ($p=0,003$), указывающая на повышенный риск манифестации болезни с рождения у детей с мутациями остатков глицина ОШ=6,1 (ДИ 1,7–24,0) (табл. 50).

Таблица 50. Расчет ассоциации мутаций остатков глицина, расположенных в центральном домене генов *COL1A1* и *COL1A2*, с возрастом манифестации НО у российских детей

Мутация остатков глицина	Число пациентов с манифестацией НО		р-значение (критерий Фишера)
	с рождения	в другом возрасте	
<i>Есть</i>	15	12	0,003
<i>Нет</i>	6	30	

Кроме того, была проведена оценка степени тяжести поражения костной системы у всех детей с НО. Дети с тяжелым («+++») поражением костной системы имели множественные переломы, полученные при рождении и в первые месяцы жизни, выраженную деформацию конечностей, задержку физического развития, нарушение минерализации костей черепа. Дети со средним («++») поражением костной системы имели множественные переломы костей, преимущественно конечностей и костей таза, с раннего возраста. У этих детей выявлялась легкая деформация конечностей и изменение цвета эмали зубов. Дети с мягким («+») течением болезни в большинстве случаев имели множественные переломы длинных трубчатых костей.

При сравнении группы пациентов с мутациями остатков глицина в генах *COL1A1* и *COL1A2* с пациентами, имеющими любые другие мутации этих же генов, была получена достоверная ($p=0,002$) ассоциация, указывающая на повышенный риск развития тяжелого («+++») поражения костной системы у детей с мутациями остатков глицина в генах *COL1A1* и *COL1A2* ОШ=6,7 (ДИ 1,8–28,5) (табл. 51).

Таблица 51. Расчет ассоциации мутаций остатков глицина, расположенных в центральном домене генов *COL1A1* и *COL1A2*, с тяжестью поражения костной системы у российских детей с НО

Мутация остатков глицина	Число детей с поражением костной системы		р-значение (критерий Фишера)
	тяжелым («+++»)	мягким («+») и средним («++»)	
<i>Есть</i>	13	14	0,002
<i>Нет</i>	5	37	

Таким образом, замены остатков глицина центрального домена на другие аминокислотные остатки в генах *COL1A1* и *COL1A2* достоверно чаще встречаются у российских детей с ранней манифестацией НО и тяжелым поражением костной системы по сравнению с пациентами, имеющими любые другие мутации этих же генов, что сочетается с генотип-фенотипическими корреляциями, выявленными в ряде зарубежных исследований [343, 792].

Хрупкость костей и повышенная восприимчивость к переломам в отсутствии травм или с минимальной травмой являются типичными признаками НО. В нашем исследовании у пациентов с НО, тип I было меньше переломов (в среднем 5,4), и эти переломы произошли позже (средний возраст 2 года и 4 месяца), по сравнению с пациентами с НО, тип III/IV/V/VI (среднее число переломов 7,3 в среднем возрасте 4 месяца). При этом нам удалось описать лишь одного ребенка с НО, не имевшего переломов к моменту проведения исследования, хотя, по некоторым данным, у 10% детей с НО, тип I, не наблюдается переломов в детстве [966]. Вероятно, минимальное число таких случаев в нашем исследовании может быть связано с отсутствием настороженности в отношении НО у врачей, консультирующих детей без переломов.

2.4. ОПИСАНИЕ НОВЫХ ПАТОГЕННЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ *COL1A1*, *COL1A2*, *IFITM5* И *SERPINF1*

Проведенное исследование позволило обнаружить 23 не описанных ранее в базе HGMD варианта, что составляет 41,1% всех найденных мутаций (рис. 77). Эти варианты были подвергнуты биоинформатическому анализу и анализу сегрегации. Особенно следует отметить, что все 23 варианта не числятся в базе данных gnomAD [376], являясь синглтонами, что дополнительно может указывать на их этиопатогенетическую значимость.

Анализ фенотипических проявлений у детей с не описанными ранее вариантами генов *COL1A1* и *COL1A2* позволил выставить им клинические диагнозы, определяя тем самым связь новой мутации с типом НО (табл. 52).

Несмотря на многочисленные исследования генетических причин возникновения НО, проведенные в мире, по-прежнему обращает на себя внимание высокий процент новых мутаций, описанных даже в недавних публикациях [456, 593], что может быть связано со значительной

Таблица 52. Клинические характеристики детей с НО, описанные при постановке диагноза, вызванного патогенными и вероятно

Ген	Нуклеотидный вариант	Аминокислотный вариант	Пол	Возраст манифестации, мес	Возраст постановки диагноза, мес
COL1A1	<i>c.494dup</i>	<i>p.Y165*</i>	м	с рождения	60
COL1A1	<i>c.617G>A</i>	<i>p.G206D</i>	м	с рождения	1
COL1A1	<i>c.2418del</i>	<i>p.G809Afs*299</i>	м	с рождения	67
COL1A1	<i>c.1551_1554dup</i>	<i>p.P519Wfs*20</i>	ж	9	9
COL1A1	<i>c.4328C>T</i>	<i>p.A1443V</i>	м	0,1	3
COL1A1	<i>c.642+1G>C</i>		ж	с рождения	3
COL1A1	<i>c.1900C>T</i>	<i>p.Q634*</i>	ж	60	72
COL1A1	<i>c.1900C>T</i>	<i>p.Q634*</i>	м	30	71
COL1A1	<i>c.1900C>T</i>	<i>p.Q634*</i>	м	24	47
COL1A1	<i>c.299dup</i>	<i>p.S101Vfs*68</i>	ж	36	120
COL1A1	<i>c.2272G>A</i>	<i>p.G758S</i>	м	с рождения	4
COL1A1	<i>c.977G>T</i>	<i>p.G326V</i>	ж	с рождения	5
COL1A1	<i>c.2128-2A>C</i>		м	1	3
COL1A1	<i>c.578dup</i>	<i>p.G194Wfs*14</i>	м	18	49
COL1A1	<i>c.751-2A>T</i>		м	20	32
COL1A1	<i>c.3815-1G>A</i>		ж	36	109
COL1A1	<i>c.1040G>A</i>	<i>p.G347D</i>	м	с рождения	2
COL1A1	<i>c.3877A>G</i>	<i>p.M1293V</i>	м	8	48
COL1A2	<i>c.758G>T</i>	<i>p.G253V</i>	м	1,5	13
COL1A2	<i>ex. 5-9del</i>		ж	9	20
COL1A2	<i>ex. 50del</i>		м	96	117
SERPINF1	<i>c.185G>T</i>	<i>p.G62V</i>	м	12	24
	<i>c.992_993insCA</i>	<i>p.E331Dfs*3</i>			
IFITM5	<i>c.306del</i>	<i>p.L103Wfs*3</i>	м	1,5	12

Примечание. н/д – нет данных.

патогенными вариантами генов *COL1A1*, *COL1A2*, *IFITM5* и *SERPINF1*, не описанными ранее. Корреляции генотипа и фенотипа

Тип	Число переломов	Голубые склеры	Нарушение слуха/ зрения	Несовершенный дентиногенез	Деформация конечностей/ позвоночника	Гипермобильность суставов	Гиперэластичность кожи	Мышечная слабость	Остеопения/ остеопороз	Низкое физическое развитие
1	5	-	-	-	+	+	-	+	-	+
4	15	+	-	-	-	-	-	+	+	+
1	4	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1	1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4	3	+	-	-	+	+	-	-	-	-
3	20	+	+	+	+	+	-	+	+	+
1	2	+	-	+	-	+	+	-	+	+
1	3	+	+	+	-	+	+	-	+	-
1	4	+	-	+	-	+	+	-	-	+
1	4	+	-	-	-	-	-	-	+	-
3	3	-	-	+	+	-	-	-	+	+
4	5	+	-	-	+	-	-	+	+	+
1	5	+	-	-	-	-	-	-	+	-
1	2	+	-	-	+	+	-	-	-	-
1	4	+	-	-	-	-	-	-	+	+
1	7	+	-	-	-	-	+	-	-	-
3	4	н/д	-	н/д	+	+	-	+	+	+
1	6	+	-	-	-	+	-	-	-	-
1	3	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4	4	+	-	+	+	+	+	+	-	-
1	8	-	+	+	-	-	-	-	-	-
6	7	-	-	-	+	-	-	+	+	-
5	5	+	+	н/д	+	н/д	н/д	+	-	+

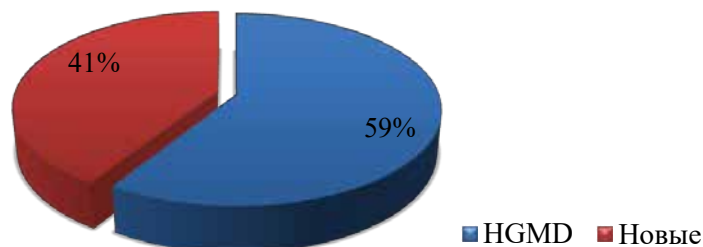


Рис. 77. Соотношение вариантов генов *COL1A1*, *COL1A2*, *IFITM5* и *SERPINF1*, описанных и не описанных ранее в международной базе данных HGMD, у детей с НО

протяженностью кодирующих областей генов *COL1A1* и *COL1A2*, с их слабой изученностью в некоторых популяциях, а также с высоким числом мутаций, возникающих спорадически.

Для 59 (85,5%) случаев НО были обследованы родители, что позволило установить отцовское происхождение мутаций в 19 (32,2%) случаях, материнское – в 12 (20,3%) случаях, а 28 (47,5%) случаев НО возникли спонтанно. Мировой опыт указывает на то, что большинство спорадических случаев НО вызваны мутациями *de novo* в генах *COL1A1* и *COL1A2* [201] и, следовательно, представляют собой минимальный риск болезни у братьев и сестер пробанда. Однако имеются данные [221], описывающие повторные случаи возникновения НО, связанные с родительским мозаицизмом. Родитель, являясь носителем мозаичной мутации, может не иметь клинических проявлений НО, либо иметь минимальные, в зависимости от степени мозаичности [344]. Секвенирование по Сэнгеру не позволяет выявить мозаицизм, составляющий менее 10%, однако минимальная интенсивность сигнала от мутантного аллеля в точке изменения референсной последовательности у матери одного из детей с НО, тип III заставила усомниться в истинности результата и прицельно исследовать эту таргетную область генома матери путем секвенирования нового поколения с высоким покрытием, что позволило подтвердить мозаичность мутации. Таким образом, когда отец или мать ребенка с тяжелой формой НО демонстрируют какую-либо минимальную аномалию соединительной ткани, важность определения мозаицизма мутации ребенка в одном из их геномов приобретает особую значимость для медико-генетического консультирования.

2.5. ВЫВОДЫ

Разработанный метод генетической диагностики НО позволил провести исследование 70 российским детям с подозрением на НО и выявить мутации у 69 пациентов из 65 семей, обнаружив 52 различных патогенных и четыре вероятно патогенных варианта в четырех исследованных генах и описав 23 новых варианта. Благодаря проведенному анализу полученных данных, впервые были выявлены частоты различных типов НО у российских детей, определены возрастные, географические и клинические особенности развития НО, а также описаны генотип-фенотипические корреляции определенных мутаций изученных таргетных областей генома с возрастом манифестации, типом и тяжестью течения НО. В частности, у детей, обладающих миссенс-мутациями центральных доменов генов *COL1A1* и *COL1A2*, приводящих к заменам остатка глицина на другой аминокислотный остаток, риск ранней манифестации НО 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. Кроме того, была выявлена ассоциация «количественных» мутаций гена *COL1A1* с НО, тип I ($p=0,002$), то есть наше исследование продемонстрировало, что НО, тип I достоверно чаще вызывался мутациями, приводящими к преждевременной терминации трансляции гена *COL1A1*. При этом шансы развития НО, тип I у пациентов, обладающих такими мутациями, более чем в семь раз превышали шансы развития НО, тип III и тип IV ОШ=7,2 (ДИ 2,3–22,8).

ГЛАВА 3

НЕФРОТИЧЕСКИЙ СИНДРОМ

Нефротический синдром (НС) – клиничко-лабораторный симптомокомплекс, проявляющийся периферическими, либо генерализованными отеками и сопровождаемый главным образом протеинурией, гипопроteinемией и гиперлипидемией. Это обобщающее понятие для многих болезней почек, аутоиммунной, токсической, метаболической и наследственной природы, имеющих различное течение и исход. Диапазон значений экскреции белка с мочой, характеризующий протеинурию при НС у детей, соответствует значениям более 40 мг/м²/ч [880]. Единицы измерения при этом учитывают сложность сбора суточной мочи и разную поверхность тела у детей различных возрастных групп. Кроме того, сбор первой утренней порции мочи избавляет от ложноположительного потенциально незначимого вклада ортостатической протеинурии, который может возникнуть при сборе мочи у пациентов в активный дневной период [448].

Первое упоминание о протеинурии, по всей видимости, принадлежит знаменитому древнегреческому врачу, философу и писателю Гип-



пократу, который вошел в науку как «отец медицины», обратившему внимание на то, что «когда пузырьки оседают на поверхности мочи, это указывает на заболевание почки и что болезнь будет затянута» [216]. Однако «отцом нефрологии» по праву считается английский врач Ричард Брайт, сопоставивший в своем труде классическую триаду генерализованного отека, протеинурии и сердечно-сосудистых болезней с соответствующими морфологическими изменениями [180], названную позднее его именем [334]. Джон Босток, коллега Брайта, также отметил, что высокие уровни белка в моче совпадали с низкими уровнями белка в сыворотке крови, устанавливая тем самым биохимические основы НС. В 1870 году Клебс предложил термин «гломерулонефрит» для описания экссудативных гломерулярных изменений, наблюдаемых под микроскопом [533]. В начале XX века ученые Фольгард и Фан разделили болезнь Брайта на 3 группы: нефрозы, нефриты и нефросклерозы. Появление технологии биопсии почки во второй половине XX века позволило изучать морфологию почки в динамике, электронная микроскопия позволила увидеть невидимые при помощи световой микроскопии нарушения, иммунофлуоресцентная диагностика доказала иммунную этиологию многих болезней почек, а молекулярно-генетическая диагностика выявила первопричины развития генетически обусловленных форм НС.

Современная классификация НС подразумевает деление на первичный (идиопатический) НС, развивающийся вследствие повреждения клубочкового аппарата почек, и вторичный НС, клубочковый аппарат почек при котором повреждается вследствие многочисленных системных заболеваний и патологических состояний. Подкатегории первичного НС, как правило, основаны на гистологических описаниях клубочковых поражений. В порядке уменьшения частоты встречаемости к ним относятся НС с минимальными изменениями (НСМИ), фокальный сегментарный гломерулосклероз (ФСГС), диффузный мезангиальный склероз (ДМС), мембранная нефропатия (МН), мембранопротрофирующий гломерулонефрит (МППН), IgA-нефропатия и другие [647]. Вторичные причины НС включают системные заболевания, такие как сахарный диабет; аутоиммунные и васкулитные заболевания (пурпура Хеноха–Шонлейна, системная красная волчанка и васкулит, ассоциированный с антинейтрофильным цитоплазматическим антителом); инфекционные заболевания (такие как врожденный сифилис, малярия, вирус иммунодефицита человека и гепатит В и С); амилоидоз и парапротеинемии; злокачественные заболевания; воздействия вредных факторов окружающей среды и наркотических веществ (ртуть, героин и др); и многие другие причины. Кроме того, с терапевтической точки зрения НС условно подразделяют на стероидчувствительный (СЧНС), стероидзависимый (СЗНС) и сте-

роидрезистентный (СРНС) в зависимости от ответа на гормональную терапию и частоты рецидивирования, что, как правило, коррелирует с морфологическим подтипом и прогнозом. Приблизительно 80% детей с первичным НС реагируют на кортикостероидную терапию, достигая полной ремиссии в течение 4 недель, и классифицируются как пациенты со СЧНС [542]. Гистология 90% таких пациентов демонстрирует НСМИ [709, 928]. Однако у 60–70% пациентов, изначально классифицированных как пациенты со СЧНС, наблюдается более одного рецидива [920]. 30% таких детей часто рецидивируют, становясь зависимыми от стероидов, и классифицируются как пациенты с СЗНС [698]. Остальные 10–20% детей, демонстрирующих протеинурию после 4 недель ежедневной терапии преднизолоном в дозе 2 мг/кг/сут, считаются стероидрезистентными [798]. У 36–50% пациентов со СРНС развивается терминальная стадия ХПН (тХПН) в течение 10 лет [656].

В Северной Америке и Европе совокупный показатель распространенности НС составляет приблизительно 2–7 случаев на 100 000 детей в возрасте до 16 лет [303, 306]. В Новой Зеландии заболеваемость НС составляет почти 2 случая на 100 000 детей в возрасте до 15 лет [1031]. В финской популяции и популяции меннонитов врожденный НС возникает в 1 случае из 10 000 или в 1 случае из 500 живых новорожденных соответственно, указывая на эффект основателя [717].

У азиатских детей отмечается шестикратное увеличение заболеваемости НС по сравнению с европейскими детьми, тогда как у афро- и латиноамериканских детей отмечается лишь незначительное увеличение риска СРНС и ФСГС [173]. На африканском континенте случаи первичного НС и СЧНС регистрируются реже, чем случаи вторичного НС и СРНС. Эти различия в этническом и географическом распределении НС подчеркивают генетическую составляющую, а также влияние факторов окружающей среды, в первую очередь инфекций, на развитие НС [717, 718].

У детей в возрасте до 8 лет соотношение мужчин и женщин варьируется от 2:1 до 3:2 в различных исследованиях. У детей старшего возраста, подростков и взрослых распространенность среди мужчин и женщин примерно одинаковая. На основании результатов биопсии почки в структуре НС преобладают дети с НСМИ (76,6%) и лишь в 7% случаев НС связаны с ФСГС [709]. При этом одни ученые отмечают двукратное увеличение заболеваемости ФСГС в последние десятилетия [167], тогда как другие не обнаруживают признаков увеличения заболеваемости ФСГС [173]. 70% пациентов с НСМИ моложе 5 лет и лишь 20–30% подростков болеют НСМИ. В первый год жизни преобладают генетические формы НС и вторичный нефротический синдром, имеющий инфекционную природу [303]. НС, манифестирующий при рожде-

нии или в течение первых 3 месяцев жизни, называется врожденным нефротическим синдромом, тогда как термин инфантильный нефротический синдром используется для НС, манифестирующего от 3 до 12 месяцев. От 1 года до 5 лет манифестирует детская форма НС, а позднее – подростковая и взрослая формы НС.

НС является следствием первичного уменьшения селективности фильтрационного барьера клубочковой капиллярной стенки, поэтому знание механизма клубочковой фильтрации является обязательным для понимания причин развития НС. Почечный фильтрационный аппарат клубочкового капиллярного пучка состоит из трех основных слоев: внутреннего слоя с проницаемыми эндотелиальными клетками с порами 100–150 нм, гломерулярной базальной мембраны с порами 5–7 нм и внешнего висцерального эпителиального (подоцитового) слоя [753]. Микрофиламенты и актиновые нити, способные сокращаться, плотно накапливаются под внутренней мембраной и образуют петлеобразные пучки в ножках подоцита [1013], которые, взаимодействуя с соседними ножками, образуют извилистые щели фильтрации шириной около 25–40 нм, соединенные щелевой диафрагмой (ЩД) [753]. ЩД известна как барьер фильтрации, потому что она удерживает белки из крови, пропускающая при этом другие молекулы, такие как сахара и соли. ЩД содержит нефрин и другие структурные белки, тесно связанные с актиновым цитоскелетом посредством адаптеров CD2AP, ZO-1, β -катенин, Nck и p130Cas, расположенных во внутриклеточном пространстве ЩД в районе липидных мостиков [413]. Сигнальные пути от этих молекул ЩД через адаптеры регулируют структуру подоцитов, клеточную адгезию, выживание/апоптоз, дифференцировку и клеточный гомеостаз [327].

Присутствие на поверхности гломерулярной базальной мембраны различных полианионов, таких как гепарансульфат, хондроитинсульфат и сиаловая кислота, определяет ее отрицательный заряд. Этот отрицательный заряд действует как сдерживающий фактор для фильтрации отрицательно заряженных белков, таких как альбумин. Экспериментальные модели, в которых отрицательно заряженные полианионы удаляются из базальной мембраны, показывают увеличение альбуминурии. У детей с НСМИ анионный заряд базальной мембраны клубочка уменьшен [950].

Благодаря развитию молекулярной генетики, идиопатические причины первичного НС все чаще объясняются генетической этиологией. В настоящее время известно приблизительно о 50 генах, мутации которых приводят к развитию НС, вызывая 57–100% семейных и 10–20% спорадических случаев НС [645]. Большинство генетически обусловленных случаев НС сопровождается ФСГС [502] и имеет моногенные причины, представляя изолированное клубочковое заболевание или

синдромальное состояние с экстраренальными проявлениями. Стероидная терапия эффективна лишь у 8–10% таких больных, остальные случаи сопровождаются проявлениями множественной лекарственной устойчивости [198]. За последнее десятилетие молекулярно-генетические исследования подчеркнули центральную роль подоцитов в патогенезе генетических форм НС, значительно расширив наше понимание о патофизиологии и гетерогенности НС по отношению к клиническим проявлениям, терапевтическим подходам и прогностическому суждению [368]. Генетические мутации изменяют структуру и функцию различных кодируемых белков, экспрессирующихся в подоцитах, включая клеточную мембрану, цитоплазму, ядро, цитоскелет, митохондрии и лизосомы (рис. 78) [798].

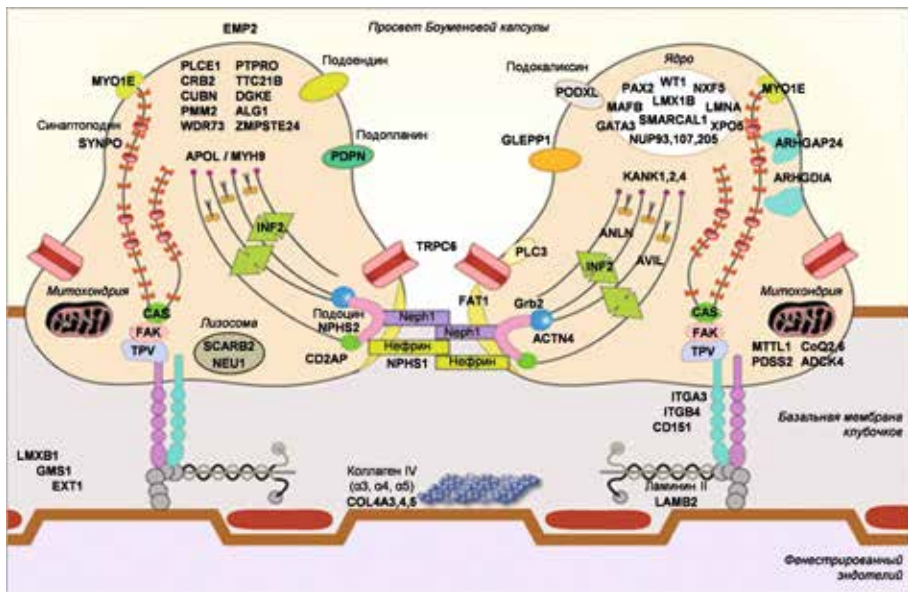


Рис . 78. Схематическое изображение различных подоцитарных белков, мутации которых приводят к развитию НС. Адаптировано из публикации Rheault M.N. и соавт., 2016 [798]

Обнаруженные к настоящему времени подоцитарные белки относятся к следующим категориям: белки, расположенные в области ШД и связанные адаптерами; белки, участвующие в регуляции актина, необходимые для поддержания структуры и функции подоцитов; адгезивные белки базальной мембраны и ее компонентов; белки апикальной мембраны, поляризирующие клетку; факторы ядерной транскрипции; белки митохондрий и лизосом, играющие основную роль в метаболизме подоцитов и другие внутриклеточные белки (табл. 53) [78].

Таблица 53. Гены, ответственные за развитие НС, и вызываемые ими клинические проявления

Ген, OMIM	Локус, тип наследования	Белок	Фенотип
Белки, формирующие щелевую диафрагму и сигнальные белки			
<i>CD2AP</i> , 604241	6p12.3, АД/АР	CD2-ассоциированный белок	СРНС
<i>FAT1</i> , 600976	4q35.2, АР	Атипичный кадхерин, 1	НС, цилиопатии
<i>NPHS1</i> , 602716	19q13.12, АР	Нефрин	СРНС, врожденный НС
<i>NPHS2</i> , 600995	1q25.2, АР	Подоцин	СРНС, врожденный НС
<i>PLCE1</i> , 608414	10q23.33, АР	Фосфолипаза С, эпсилон-1	СРНС, ДМС
Белки, формирующие компоненты цитоскелета			
<i>ACTN4</i> , 604638	19q13.2, АД	Альфа-актинин, 4	СРНС, ФСГС
<i>ANLN</i> , 616027	7p14.2, АД	Анилин	ФСГС
<i>ARHGAP24</i> , 610586	4q22.1, АД	RhoGTP-аза-активирующий белок 24	ФСГС (подростковый)
<i>ARHGDI1</i> , 601925	17q25.3, АР	Rho GDP ингибитор-диссоциации	СРНС (детский)
<i>INF2</i> , 610982	14q32.33, АД	Инвертированный формин, 2	СРНС, ФСГС, болезнь Шарко–Мари–Тута с гломерулопатией
<i>MYH9</i> , 160775	22q12.3, АД	Тяжелая цепь миозина, 9	Макротромбоцитопения с сенсоневральной тугоухостью, ФСГС, синдромы Себастиана, Эпштейна, Фечтнера
<i>MYO1E</i> , 601479	15q22.2, АР	Миозин, 1E	СРНС, ФСГС (детский)
Белки, формирующие клубочковую базальную мембрану и другие базальные мембраны			
<i>CD151</i> , 602243	11p15.5, АР	CD151 антиген	Нефропатия с буллезным эпидермолизом и глухотой, терминальная стадия ХПН

Продолжение таблицы 53

Ген, OMIM	Локус, тип наследования	Белок	Фенотип
<i>COL4A3</i> , 120070	2q36.3, АД/АР	Коллаген, тип 4, альфа 3	Синдром Альпорта, ФСГС
<i>COL4A4</i> , 120131	2q36.3, АР	Коллаген, тип 4, альфа 4	Синдром Альпорта, ФСГС
<i>COL4A5</i> , 303630	Xq22.3, ХР	Коллаген, тип 4, альфа 5	Синдром Альпорта, ФСГС
<i>EXT1</i> , 108177	8q24.11, АР	Экзостозин-глюкозилтрансфераза	СРНС
<i>ITGA3</i> , 605025	17q21.33, АР	Интегрин, бета 3	СРНС, ФСГС, буллезный эпидермолиз
<i>ITGB4</i> , 147557	17q25.1, АР	Интегрин, бета 4	Буллезный эпидермолиз с НС и ФСГС
<i>LAMB2</i> , 150325	3p21.31, АР	Ламинин, бета 2	ФСГС, синдром Пирсона (ДМС)
Ядерные белки			
<i>GATA3</i> , 131320	10p14, АД	ГАТА-связывающий белок 3	Гипопаратирозидизм, сенсоневральная тугоухость, аномалии почек
<i>LMNA</i> , 150330	1q22, АД	Ламин А/С	ФСГС, семейная частичная липодистрофия
<i>LMX1B</i> , 602575	9q34.1, АД	ЛМ-гомеобокс транскрипционный фактор 1β	НС, синдром ногтевой пластины (ФСГС)
<i>MAFB</i> , 608968	20q12, АД	А-транскрипционный фактор	Синдром карпотарзального остеолита
<i>NUP93</i> , 614351	16q13, АР	Нуклеопорин 93кДа	СРНС
<i>NUP107</i> , 607617	12q15, АР	Нуклеопорин 107кДа	СРНС, ФСГС (ранний детский)
<i>NUP205</i> , 614352	7q33, АР	Нуклеопорин, 205 кДа	СРНС
<i>NXF5</i> , 300319	Xq22.1, ХР	Экспортный фактор ядерной РНК, 5	СРНС, ФСГС, нарушение сердечной проводимости



Продолжение таблицы 53

Ген, OMIM	Локус, тип наследования	Белок	Фенотип
<i>PAX2</i> , 616002	10q24.31, АД	Спаренный бокс 2	СРНС, ФСГС (поздний детский, взрослый), синдром почечной колобомы
<i>SMARCAL1</i> , 606622	2q35, АР	SWI/SNF-родственный, матрикс-ассоциированный, актин-зависимый регулятор хроматина, подсемейство А-подобный белок-1	Дисплазия Шимке, ФСГС, СРНС с ранним началом
<i>WT1</i> , 607102	11p13, АД	Опухоль Вильмса	СРНС, синдромы Дэниса–Драша (ДМС) и Фрейзера (ФСГС)
Митохондриальные белки			
<i>COQ2</i> , 609825	4q21.22-q21.23, АР	Коэнзим Q2 полипренил-трансфераза	СРНС с ранним началом, дефицит КоQ10
<i>COQ6</i> , 614647	14q24.3, АР	Коэнзим Q6 монооксидаза	НС с сенсоневральной тугоухостью, дефицит КоQ10
<i>COQ8B</i> , 615567	19q13.2, АР	Коэнзим Q8B	СРНС, первичный дефицит КоQ10 (детский)
<i>MTTL1</i> , 590050	mtDNA, материнский	Митохондриальная тРНК, лейцин 1	Тугоухость с ФСГС, синдром МЕЛАС
<i>PDSS2</i> , 610564	6q21, АР	Декапренил-дифосфат-синтаза 2	ФСГС, синдром Лея, дефицит КоQ10
Лизосомные белки			
<i>NEU1</i> , 608272	6p21.33, АР	Сиалидаза лизосомная	СРНС, нефросиалидоз
<i>SCARB2</i> , 602257	4q21.1, АР	Лизосомный интегральный мембранный белок, тип II	Миоклоническая эпилепсия с почечной недостаточностью (ФСГС)

Продолжение таблицы 53

Ген, OMIM	Локус, тип наследования	Белок	Фенотип
Белки апикальной мембраны			
<i>EMP2</i> , 602334	16p13.13, АД	Эпителиальный мембранный белок 2	СРНС, СЧНС
<i>TRPC6</i> , 603652	11q22.1, АД	Переходный рецептор катионного канала потенциалов, подсемейство С, член 6	СРНС, ФСГС
Другие внутриклеточные белки			
<i>ALG1</i> , 605907	16p13.3, АР	β -1,4-маннозил-трансфераза	Врожденный НС, врожденная болезнь гликозилирования, Iк
<i>APOL1</i> , 603743	22q12.3, АР	Аполипопротеин Л1	ФСГС
<i>CUBN</i> , 602997	10p13, АР	Кубилин	СРНС с мегалобластной анемией (детский)
<i>CRB2</i> , 609720	9q33.3, АР	Крумбс гомолог, 2	Семейный СРНС с ранним началом, ФСГС
<i>DGKE</i> , 6014400	17q22, АР	Диацилглицеролкиназа, epsilon	Мембранопролиферативный гломерулонефрит, АГУС
<i>PTPRO</i> , 600579	12p12.3, АР	Рецептор тирозинфосфатазы, тип О	СРНС
<i>PMM2</i> , 601785	16p13.2, АР	Фосфоманнотугаза, 2	ФСГС, врожденная болезнь гликозилирования, Iа
<i>TTC21B</i> , 612014	2q24.3, АР	Тетратрикопептидный повтор содержащий белок 21В	ФСГС, нефронофтиз
<i>WDR73</i> , 616144	15q25.2, АР	WD повтор содержащий белок 73	СРНС, синдром Галлова-Мовата ФСГС, ДМС
<i>ZMPSTE24</i> , 606480	1q34, АР	Цинковая металлопротеиназа	ФСГС, мандибулоакральная дисплазия

Большинство рецессивных мутаций генов *NPHS1*, *NPHS2*, *LAMB2* и *PLCE1* вызывают тяжелые клинические проявления врожденного НС, либо НС с ранним началом, и прогрессирование до терминальной стадии ХПН в младенчестве, либо в раннем детстве. Рецессивные мутации генов *CD2AP* и *MYO1E* вызывают тяжелые проявления НС в детстве и прогрессируют до терминальной стадии ХПН, как правило, во второй декаде жизни. Аутосомно-доминантные формы НС встречаются редко, в основном в подростковых и взрослых семейных случаях. Доминантные мутации генов *ACTN4*, *TRPC6* и *INF2* связаны с поздней манифестацией протеинурии и прогрессированием до терминальной стадии ХПН в течение третьего и четвертого десятилетий жизни [506]. Нефрин и подоцин преимущественно локализируются на поверхности подоцитов, а также в ЩД, являясь ее основными структурными элементами. Молекулы нефрина и подоцина, расположенные на поверхности соседних клеток, помогают ретранслировать сигналы клеток, позволяя подоцитам связываться друг с другом и адаптироваться к изменениям, происходящим в процессе фильтрации. Кроме того, подоцин, вероятно, помогает транспортировать другие белки, которые необходимы для функционирования щелевой диафрагмы, на поверхность клеток подоцита.

НС, вызываемый мутациями гена *NPHS1*, характеризуется массивной протеинурией в первый год жизни и прогрессированием до терминальной стадии ХПН в возрасте 2–8 лет, хотя описаны и более мягкие формы заболевания [364]. Большинство случаев НС финского типа развивается с момента рождения, при этом существуют описания детей с более поздней манифестацией СРНС в возрасте от 6 месяцев до 8 лет [758], а также случаи возникновения НС финского типа во взрослом возрасте [827, 1030]. Мутации гена *NPHS1* вызывают все случаи врожденного нефротического синдрома финского типа, встречаясь в основном у людей финского происхождения. При этом они являются менее распространенной причиной НС в других популяциях, по сравнению с патологическими изменениями гена *NPHS2*, мутации которого составляют приблизительно 45–55% семейных и 8–20% спорадических случаев СРНС [364].

Мутации в других генах вызывают сравнительно небольшое число случаев врожденного нефротического синдрома. Мутации в регуляторном гене *WT1* вызывают несколько форм врожденного и инфантильного нефротического синдрома, ассоциированного с мужским псевдогермафродитизмом, синдромом Дениса–Драша и синдромом Фрайзера. Ген *WT1* кодирует белок, необходимый для развития почек и гонад, играет роль в клеточном росте, клеточной дифференцировке и апоптозе. Для осуществления этих функций белок *WT1* регулирует актив-

ность других генов путем связывания с определенными областями ДНК, являясь транскрипционным фактором.

PLCE1, расположенный в хромосомной области 10q23.33, кодирует фермент фосфолипазу С эпсилон-1, цитоплазматический фермент, необходимый для созревания подоцитов. В качестве эффектора гетеротримерного и небольшого G-белка он может играть роль в выживании клеток, клеточном росте, активации актина и активации Т-клеток. Мутации в этом гене вызывают НС, манифестирующий до 2 лет, на долю которого приходится до 28% случаев ДМС, а также ФСГС [367].

Актинин-4, кодируемый геном *ACTN4*, расположенный в хромосомной области 19q13.2, сшивает актиновые филаменты цитоскелета подоцитов и закрепляет их на базальной мембране клубочков. Ген *TRPC6*, расположенный в хромосомной области 11q22.1, кодирует кальциевый канал, связанный с ЩД [364]. Мутации генов *ACTN4* или *TRPC6* связаны с аутосомно-доминантными формами ФСГС [717, 718].

Мутации гена *LMX1B*, расположенного в хромосомной области 9q33.3, и кодирующего белок, регулирующий экспрессию коллагена типа IV, нефрина, подоцина и CD2AP, вызывают синдром ногтевой пластины и надколенника, проявляющийся НС, дисплазией скелета и ногтей, а также гипоплазией надколенника [950]. Однако специфические мутации *LMX1B* были обнаружены и у индивидуумов с изолированным СРНС [174].

Мутации гена *LAMB2*, расположенного в хромосомной области 3p21.31, и кодирующего ламин b2, который находится в основной мембране клубочков, вызывают изолированный НС либо синдром Пирсона, характеризующийся микрокорией, аномальной формой хрусталика, катарактой, слепотой, тяжелым неврологическим дефицитом, врожденным НС и прогрессирующей почечной недостаточностью [364].

Большинство семейных случаев ФСГС наследуются в соответствии с аутосомно-доминантным типом наследования с неполной пенетрантностью. До 17% случаев приходится на мутации гена *INF2*, до 12% случаев – на мутации гена *TRPC6*, 3,5% – на мутации генов *ACTN4*, *PAX2* и *SCARB2* [809]. У младенцев с врожденным или инфантильным НС ДМС наблюдается гораздо чаще ФСГС [822]. Дети с врожденным НС обычно имеют мутации в генах: *PLCE1*, *LAMB2*, *WT1*, *NPHS1*, *NPHS2*, при этом гистология таких детей редко сопровождается НСМИ [822]. Мутации гена *NPHS2*, преждевременно прерывающие синтез кодируемого белка, сопровождаются фенотипом ДМС, тогда как миссенс-мутации того же гена, как правило, обуславливают фенотип ФСГС [599]. Нерегулярная микрокистозная дилатация проксимальных канальцев является характерным гистологическим признаком пациентов с мутациями гена *NPHS1*, что может быть полезно для разработки алгоритма поиска мутаций методом Сэнгера [612].



Экстраренальные проявления синдромальных форм ФСГС являются наиболее заметными и могут быть результатом мутаций в генах, кодирующих транскрипционные факторы (*WT1*, *LMX1B*), компоненты гломерулярной базальной мембраны (*LAMB2*, *ITGB4*), лизосомные (*SCARB2*) и митохондриальные (*COQ2*, *PDSS2*, *MTTL1*) белки, медиатор реструктуризации ДНК-нуклеосомы (*SMARCA1*) или цитоскелетные белки, включая инвертированный формин 2 (*INF2*) и немышечный миозин IIA (*MYH9*) [1050].

Изменения в митохондриальном белке, кодируемом геном *COQ2*, связаны с синдромом, сопровождаемым энцефалопатией и нефропатией. Мутации генов *COL4A3*, *COL4A4* и *COL4A5* вызывают синдром Альпорта, характеризующийся гломерулонефритом, ХПН, поражением глаз и нейросенсорной тугоухостью. Мутации гена *WDR73* ответственны за развитие синдрома Галловей–Мовата, характеризующегося сочетанием врожденного НС, микроцефалии и грыжи пищеводного отверстия диафрагмы. Мутации гена *OCRL* являются причиной развития синдрома Лоу, проявляющегося глаукомой, катарактой, гипотонией, задержкой умственного развития. Мутации в медиаторе реорганизации ДНК-нуклеосом *SMARCA1* описаны у пациентов с синдромом Шимке, характеризующимся спондилоэпифизарной дисплазией, непропорционально низким ростом, нефропатией и дефицитом Т-клеток [133].

Согласно обнаруженным феногенотипическим корреляциям алгоритм молекулярно-генетической диагностики методом Сэнгера может определяться на основе типа наследования, возраста дебюта, гистологической картины почек и наличия внепочечных пороков развития. К примеру, Бенуа с соавторами предложили алгоритм диагностики, изображенный на рис. 79 [133].

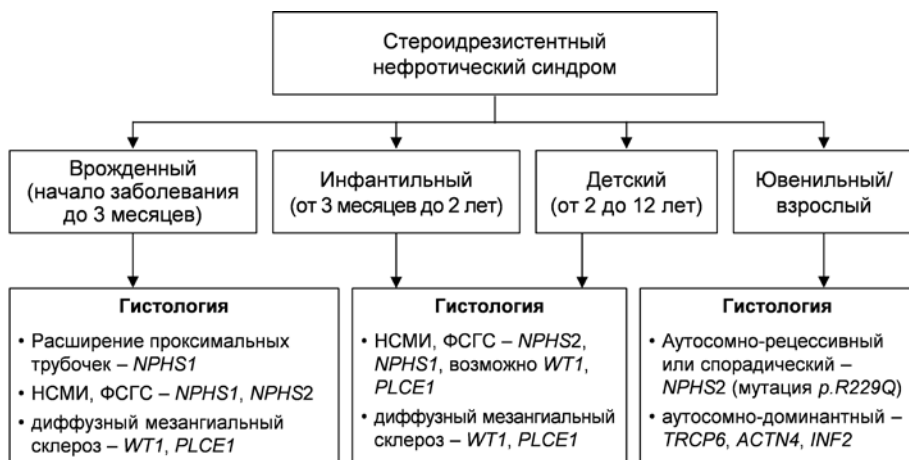


Рис. 79. Алгоритм диагностики СРНС, предложенный Бенуа с соавт. [120]

15–20% лиц с врожденным НС не имеют идентифицированных мутаций ни в одном из известных генов, связанных с этим заболеванием. В этих случаях причиной состояния могут являться инфекции, врожденный сифилис или токсоплазмоз, болезнь может быть вызвана мутациями в новых генах, либо носить идиопатический характер. С открытием различных дефектов генов, связанных с развитием НС, расширяются знания о различных сигнальных путях подоцитов, которые могут играть роль в патогенезе нефротического синдрома [402]. Понимание этих механизмов необходимо для разработки будущей целевой терапии НС, и в первую очередь СРНС.

Таким образом, в дополнение к традиционным иммунологическим теориям патогенеза НС, в последние годы НС все чаще стали называть подоцитопатией. Помимо всего прочего, на поверхности подоцитов расположены глюкокортикоидные рецепторы, что используется при лечении идиопатического НС для стабилизации цитоскелета подоцитов и ингибирования апоптоза. Циклоспорин также может действовать непосредственно на подоцит, ингибируя фосфорилирование синаптоподина, который играет важную роль в поддержании базальной мембраны клубочков в функциональном состоянии [307]. Однако при идиопатическом НС ведущим терапевтическим механизмом является действие преднизолона и циклоспорина на Т-лимфоциты [64].

Прогноз НС может быть столь же различен, как и лежащая в его основе патология. При возникшей у новорожденного или грудного ребенка изолированной протеинурии необходимо проведение дифференциальной диагностики среди врожденного НС финского типа с микрокистозом и французского типа с диффузным мезангиальным склерозом, НС с минимальными изменениями, НС при врожденной цитомегаловирусной инфекции, токсоплазмозе, сифилисе, микроцефалии, туберкулезе, гипотиреозидизме, нефробластоме, ГУСе, синдроме ногтевой пластины и надколенника и других заболеваний.

С момента введения кортикостероидов в протоколы лечения НС общая смертность больных резко снизилась с более чем 50% до примерно 2–5%. Несмотря на значительное улучшение показателей выживаемости, приблизительно в 60% случаев НС является хронической рецидивирующей болезнью, требуя повторного введения лекарств, связанных со значительными побочными эффектами, в ряде случаев постепенно прогрессируя до ХПН. Кроме того, НС ассоциируется с повышенным риском развития множественных осложнений, включая отеки, инфекцию, тромбоз, гиперлипидемию, острую почечную недостаточность и повышенный риск сердечно-сосудистых заболеваний. Прогноз при этом варьируется в зависимости от того, является ли НС чувствительным или устойчивым к стероидам. Пациенты, которые

остаются чувствительными к стероидам с ремиссией протеинурии, даже с частыми рецидивами, как правило, имеют хороший прогноз. Ответ на терапию стероидами напрямую коррелирует с морфологическими изменениями почек и генетической этиологией болезни. У 93% детей с СЧНС биопсия почек выявила НСМИ, при этом 75% детей с СРНС имели морфологическую картину почек, отличную от НСМИ [928]. Долгосрочное исследование 398 детей с НС показало, что процент детей, у которых прекратились рецидивы, вырос с 44% до 69% через 5 лет и до 84% через 10 лет после постановки диагноза и начала терапии [303]. В ретроспективном исследовании Vivarelli с соавторами сообщили, что длительность времени между началом лечения стероидами и ремиссией НС является ранним прогностическим показателем, определяя 7 дней как медиану от начала лечения до ремиссии для пациентов, которые не демонстрировали рецидивов или рецидивировали нечасто [991]. Приблизительно 1–3% пациентов, которые изначально реагируют на стероиды, впоследствии становятся устойчивыми к лечению [717, 718]. Как было отмечено выше, около 50% пациентов с СРНС прогрессируют до терминальной стадии ХПН, что заставляет прибегать к проведению диализа или трансплантации почек для выживания. При этом проводят коррекцию гипотиреоза, минеральных нарушений, осуществляют профилактику тромбозов и инфекционных осложнений [46]. В редких случаях пациенты с СРНС имеют хороший прогноз, если ремиссия протеинурии достигается другими препаратами [382, 745]. Например, при обнаружении мутаций в генах, продукты которых участвуют в биосинтезе коэнзима Q10 (*COQ2*, *COQ6*, *COQ8B* или *PDSS2*), может быть рекомендована терапия препаратами, содержащими коэнзим Q10 [425]. Кроме того, существует описание ответа на терапию стероидами или циклоспорином А двух пациентов с рецессивными мутациями в гене *PLCE1* [440]. Наконец, люди с мутациями гена *CUBN* могут поддаваться лечению витамином B12, а люди с *ARHGDI1A* могут реагировать на лечение эплереноном [369].

Особую важность имеет своевременная молекулярно-генетическая диагностика СРНС, проявляющегося изолированной протеинурией у новорожденных и грудных детей, а также детей раннего возраста, так как вероятность наследственно обусловленного НС в этих случаях очень высока. Отсутствие мутаций у таких пациентов может указывать на большую вероятность успеха терапии циклоспорином по сравнению с пациентами, имеющими мутации в целевых областях генома, указанных в табл. 53 [199]. При этом СРНС является второй по частоте причиной достижения терминальной стадии ХПН в первые два десятилетия жизни [822], заставляя разрабатывать более успешное лечение, чем существующее ныне, что, в свою очередь, невозможно

без прояснения патогенеза болезни и выявления его этиологических причин. Кроме того, молекулярно-генетическая диагностика помогает клиницистам принять решение об отмене иммуносупрессивных препаратов, избавляя детей со СРНС от серьезных побочных эффектов [730]. В наши задачи входило выявление данных о частоте и структуре различных генетических форм НС среди детей, проживающих на территории России, а также прояснение корреляций фенотипа и генотипа для дальнейшей разработки тактики лечения НС на основе клинической и гистологической картины болезни с учетом генетических факторов.

3.1. ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ОСНОВ НЕФРОТИЧЕСКОГО СИНДРОМА У РОССИЙСКИХ ДЕТЕЙ

Гломерулярные заболевания являются наиболее распространенной причиной протеинурии и хронических болезней почек, приводя к терминальной стадии почечной недостаточности, требующей диализа или трансплантации почек. НС диагностируется наличием триады симптомов: протеинурии, гипоальбуминемии и отеков [212], при этом в случае отсутствия одного из симптомов НС считается неполным. НСМИ является наиболее распространенным гистопатологическим признаком НС у детей и подростков, тогда как ФСГС является наиболее распространенным гистопатологическим признаком у пациентов с генетически обусловленным моногенным НС. На сегодняшний день мутации более 50 генов идентифицируются как причинные факторы болезней, объединенных симптомокомплексом НС у детей, демонстрируя этиологическое воздействие генетических дефектов на дифференцировку и функционирование подоцитов.

3.1.1. СЕЛЕКТИВНЫЙ СКРИНИНГ НЕФРОТИЧЕСКОГО СИНДРОМА

С целью выявления генетических причин развития симптомокомплекса НС среди российских пациентов, а также описания относительных частот и спектра выявленных мутаций в рамках клинической апробации нового способа генетической диагностики генетически обусловленных болезней почек, проявляющихся симптомокомплексом НС, нами была разработана таргетная панель генов, 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 метод позволил выявить мутации у 83 (47,2%) детей из 81 семьи в возрасте от 1 месяца до 17 лет и 9 месяцев на момент проведения обследования с распределением по полу: 44 (53,0%) мальчика и 39 (47,0%) девочек из 176 обследованных детей с подозрением на генетически обусловленный НС, биоматериал которых был взят для проведения молекулярно-генетического исследования. Такой высокий, по зарубежным меркам, процент детей с симптомокомплексом НС, подтвержденных молекулярно-генетически, был описан лишь в Саудовской Аравии [85]. У остальных обследованных детей либо были выявлены доброкачественные минорные варианты генов, либо описанный тип наследования не позволял считать найденные минорные варианты патогенными. Вероятно, что мутации этих пациентов могут находиться в генах, не включенных в разработанную панель, или же симптомокомплекс этих пациентов может быть обусловлен ненаследственными факторами.

3.1.2. КЛИНИЧЕСКИЕ, ГЕОГРАФИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ НЕФРОТИЧЕСКОГО СИНДРОМА

Средний возраст пациентов с выявленными мутациями на момент проведения исследования составил 5 лет и 2 месяца, медиана – 4 года и 1 месяц. Средний возраст манифестации болезни у детей с выявленными мутациями составил 2 года и 1 месяц, медиана – 10 месяцев. При этом у 27 (32,5%) детей болезнь манифестировала в возрасте до 3 месяцев. Таких пациентов специалисты относят к категории пациентов с врожденными болезнями почек, объединенных симптомокомплексом НС [949]. Среди 35 (42,2%) пациентов с мутациями в генах с доминантным и X-сцепленным типом наследования, у 9 (25,7%) детей симптомокомплекс НС имел семейный характер (трое детей унаследовали протеинурию по отцовской линии и шестеро – по материнской линии), у 12 (34,3%) пациентов симптомокомплекс НС имел спорадический

характер, который подтверждался отсутствием клинических проявлений болезни у родителей, у 14 (40,0%) пациентов родители не были обследованы, либо об их обследовании не было достоверных данных. Наследование мутаций 48 (57,8%) обследованных детей имело аутосомно-рецессивный характер.

Географические особенности детей с генетически обусловленным симптомокомплексом НС были установлены для 80 (96%) пациентов из 78 семей (табл. 54).

Таблица 54. Распределение обследованных нами пациентов с генетически обусловленными болезнями, объединенными симптомокомплексом НС, в различных субъектах РФ

Субъект	Численность населения	Число семей	Число случаев	Частота в субъекте*
Москва	12 615 882	8	8	1:1 576 985
Вологодская область	1 167 719	4	4	1:291 930
Красноярский край	2 874 050	4	4	1:718 513
Саратовская область	2 440 729	3	4	1:610 182
Республика Крым и Севастополь	2 355 027	3	3	1:785 009
Тульская область	1 478 814	3	3	1:492 938
Челябинская область	3 475 727	3	3	1:158 576
Чеченская Республика	1 456 951	2	2	1:728 476
Кировская область	1 272 133	2	2	1:636 067
Московская область	7 599 756	2	2	1:3 799 878
Нижегородская область	3 214 657	2	2	1:1 607 329
Пермский край	2 610 800	2	2	1:1 305 400
Приморский край	1 902 719	2	2	1:1 542 869
Республика Дагестан	3 085 738	2	2	1:951 360
Республика Татарстан	3 898 700	2	2	1:1 949 350
Ростовская область	4 202 337	2	2	1:2 101 169
Тамбовская область	1 015 981	2	2	1:507 991
Тверская область	1 269 650	2	2	1:634 825
Тюменская область	3 723 984	2	2	1:1 861 992
Белгородская область	1 547 418	2	2	1:773 709
Волгоградская область	2 507 488	2	2	1:1 253 744

Продолжение таблицы 54

Субъект	Численность населения	Число семей	Число случаев	Частота в субъекте*
Кабардино-Балкарская Республика	866 310	2	2	1:433 155
Кемеровская область	2 674 283	2	2	1:1 337 142
Алтайский край	2 332 511	1	2	1:1 166 256
Амурская область	793 194	1	1	1:793 194
Архангельская область	1 144 119	1	1	1:1 144 119
Воронежская область	2 327 843	1	1	1:2 327 843
Краснодарский край	5 648 254	1	1	1:5 648 254
Курганская область	834 718	1	1	1:834 718
Липецкая область	1 144 055	1	1	1:1 144 055
Санкт-Петербург	5 383 968	1	1	1:5 383 968
Республика Башкортостан	4 051 005	1	1	1:4 051 005
Республика Тыва	324 420	1	1	1:324 420
Свердловская область	4 315 702	1	1	1:4 315 702
Смоленская область	942 363	1	1	1:942 363
Ставропольский край	2 795 103	1	1	1:2 795 103
Томская область	1 077 442	1	1	1:1 077 442
Ульяновская область	1 238 424	1	1	1:1 238 424
Хабаровский край	1 328 332	1	1	1:1 328 332
Чувашская Республика	1 223 395	1	1	1:1 223 395
Республика Саха (Якутия)	966 997	1	1	1:966 997

Примечание. *На основе выборки пациентов, обследованных в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

Все выявленные случаи детей с мутациями таргетных областей генома, для которых были установлены места их проживания, распределились по 41 (48%) субъекту РФ с преобладанием в Москве (8/10,0%), Вологодской, Саратовской областях и Красноярском крае (4/5,0%), Тульской, Челябинской областях и Республике Крым (по 3/3,8%). Значительный процент выявляемых случаев в этих восьми субъектах РФ, по всей видимости, указывает на преимущественную госпитализацию детей с НС в наш Центр именно из этих регионов РФ. Значимость определения места проживания и национальностей детей с определенными, в том числе с новыми, мутациями также актуальна, так как позволяет

связать найденные варианты генома с географическим регионом, либо с популяционной принадлежностью.

Наибольшее число детей с выявленными мутациями проживают в Центральном федеральном округе (22/27,5%). В остальных округах наблюдается приблизительно равномерная частота случаев генетически обусловленных болезней, объединенных симптомокомплексом НС. В Приволжском и Сибирском федеральных округах проживают 15 (18,8%) и 9 (11,3%) детей соответственно. В Уральском и Южном федеральных округах проживают по 8 (10%) детей, в Северо-Кавказском – 7 (8,8%), в Северо-Западном – 6 (7,2%) детей. Дальневосточный федеральный округ представлен 5 (6,0%) детьми (табл. 55).

Таблица 55. Распределение обследованных нами пациентов с генетически обусловленными заболеваниями, сопровождаемыми симптомокомплексом НС, в различных федеральных округах РФ

Федеральный округ	Численность округа	Число семей	Число пациентов	Частота в округе*
Центральный	39 378 947	22	22	1:1 789 952
Приволжский	29 397 227	14	15	1:1 959 815
Сибирский	17 173 185	8	9	1:1 908 132
Уральский	12 350 131	8	8	1:1 543 766
Южный	16 454 580	8	8	1:2 056 823
Северо-Кавказский	9 866 370	7	7	1:1 409 481
Северо-Западный	13 972 061	6	6	1:2328677
Дальневосточный	8 188 594	5	5	1:1637719

Примечание. *На основе выборки пациентов, обследованных в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

Результаты проведенного молекулярно-генетического исследования позволили впервые описать относительные частоты различных типов генетически обусловленных болезней почек, объединенных симптомокомплексом НС, у детей в РФ (рис. 80).

Наиболее распространенной формой НС, подтвержденной у 22 (26,5%) обследованных детей, является НС, тип 2, обусловленный мутациями гена *NPHS2*. Вторым по частоте встречаемости оказался НС, тип 4, обусловленный мутациями гена *WT1* и обнаруженный у 13 (15,7%) пациентов. НС, тип I был подтвержден у 7 (8,4%) детей с мутациями гена *NPHS1*. Синдром Альпорта, обусловленный мутаци-

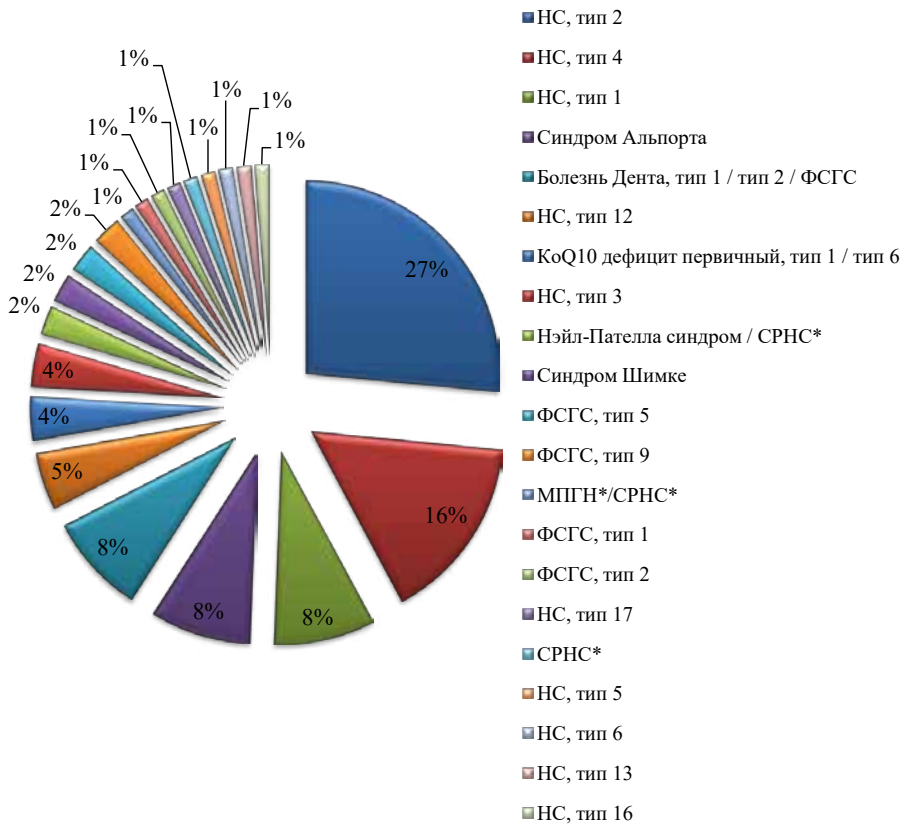


Рис. 80. Относительные частоты различных типов генетически обусловленных болезней почек, проявляющихся симптомокомплексом НС, у обследованных российских детей (* – по данным базы HGMD)

ями генов *COL4A3* и *COL4A5*, а также болезнь Дента, обусловленная мутациями генов *CLCN5* и *OCRL*, являющиеся так называемыми фенотипами НС, были выявлены также у 7 (8,4%) детей с симптомокомплексом НС. Эти моногенные болезни обусловили протеинурию нефротического диапазона в общей сложности у 59,0% детей с найденными вариантами генома. Нефротический синдром, тип 12, вызываемый мутациями гена *NUP93*, был выявлен у 4 (4,8%) детей с НС. Первичный дефицит коэнзима Q10, тип 1 и тип 6, обусловленный мутациями генов *COQ2* и *COQ6*, был обнаружен у 3 (3,6%) пациентов с НС, как и НС, тип 3, вызываемый патогенными вариантами гена *PLCE1*. Остальные моногенные болезни встретились с долями, не превышающими 2,4% (см. рис. 80). В зарубежной литературе существует описание нескольких многоцентровых молекулярно-генетических исследований моно-

генных болезней, вызывающих симптомокомплекс НС, проведенных на педиатрических когортах пациентов, в которых были получены схожие данные, описывающие преимущественную встречаемость НС, тип 1, НС, тип 2 и НС, тип 4 среди подтвержденных пациентов [822, 990]. При этом в отличие от исследования, результаты которого были опубликованы в 2007 году командой профессора Хильдебрандта, нам удалось выявить лишь одного пациента с биаллельными мутациями гена *LAMB2*, входящего в число четырех наиболее частых генов, рецессивные мутации которых, по мнению авторов, вызывают СРНС в возрасте до года [441]. Небольшая встречаемость подавляющего числа других типов НС и ФСГС, по всей видимости, связана с особенной редкостью этих гломерулопатий [247].

Анализ генетических особенностей развития генетически обусловленных моногенных болезней, протекающих с клинической картиной НС, позволил описать распределение 86 этиопатогенетических вариантов в 24 из 52 исследованных генов у 83 детей (рис. 81). Важно отметить, что патогенные варианты генома, описанные в базе данных HGMD, были обнаружены у 57 (68,7%) обследованных пациентов, что сопоставимо с выявляемостью известных мутаций в других исследованиях, проведенных на панелях с набором таргетных областей генома, отличающихся от нашего [822].

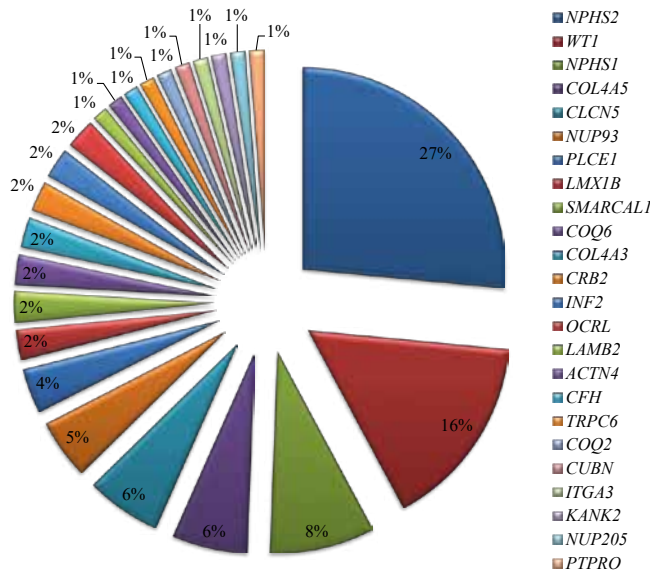


Рис. 81. Относительные частоты и спектр генов, содержащих мутации, у 83 российских детей с генетически обусловленными заболеваниями, проявляющимися симптомокомплексом НС

Из представленных данных следует, что у 42 (50,6%) пациентов были выявлены мутации генов *NPHS2*, *WT1* и *NPHS1*, что по генному составу повторяет результаты двух самых крупных генетических исследований НС, охватывающих оба американских континента, Евразию, Африку, Австралию и Новую Зеландию, при этом процент пациентов с мутациями этих трех генов в возрасте до 25 лет и до 20 лет значительно ниже (22% и 38% соответственно) [822, 949] частоты мутирования этих генов среди обследованных нами российских детей. А недавнее исследование пациентов в возрасте до 19 лет также демонстрирует преимущественную встречаемость мутаций в этих трех генах, однако доля таких пациентов (61%) [150] уже превышает наши данные, что может свидетельствовать в пользу преобладания пациентов с ранней манифестацией болезни, имеющих мутации в генах *NPHS1*, *NPHS2* и *WT1* в этой когорте детей.

Чаще других встречались патогенные варианты гена *NPHS2* [62], мутации которого вызвали НС, тип II у 22 (26,5%) пациентов (см. рис. 81). Мутации этого гена отличались наибольшим разнообразием: среди 15 (17,4%) различных выявленных вариантов 6 (40,0%) оказались не описанными ранее в базе данных HGMD. Это один патогенный *c.275G>C*, *p.G92A* (PVS1, PM2, PM3) и три вероятно патогенных миссенс-варианта: *c.897G>C*, *p.K299N* (PM1, PM2, PP3, PP4); *c.944C>T*, *p.T315I* (PM1, PM2, PP3, PP4); *c.1027C>T*, *p.P343S* (PM2, PM3, PP3, PP4), один патогенный нонсенс-вариант *c.579C>A*, *p.C193** (PVS1, PM2, PM3) и один вероятно патогенный вариант, который может оказывать влияние на сплайсинг: *c.794+7A>G* (PM1, PM2, PM3, PP4). Все эти новые варианты гена *NPHS2* являются синглтонами. Во время анализа результатов проведенного исследования было обнаружено, что нонсенс-мутация *c.259G>T*, *p.E87**, впервые описанная нашим соотечественником [943], может считаться мутацией, характерной для российской популяции, так как она встретилась у 12 (54,5%) пациентов на 20 (45,5%) аллелях, причем у восьми из них она встретилась в гомозиготном состоянии, что может свидетельствовать как о высоком проценте близкородственных браков, так и о высокой частоте гетерозиготного носительства этого варианта в нашей популяции. К географическим особенностям НС, тип 2 у обследованных нами детей можно отнести преимущественное распределение пациентов с мутацией *c.259G>T*, *p.E87** среди жителей Приволжского федерального округа, в частности, среди жителей Кировской, Саратовской, Ульяновской областей и Республики Татарстан и юга Уральского федерального округа, в частности, Челябинской, Курганской и Свердловской областей по сравнению с пациентами из других федеральных округов $p < 0,001$, ОШ=34,6 (ДИ 6,0–377,8) (табл. 56).

Таблица 56. 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	

Второй мажорной мутацией оказался вариант *c.868G>A*, *p.V290M*, выявленный на 6 (13,6%) аллелях у 4 (18,2%) пациентов. Эта мутация рекомендована к скринингу на частые мутации гена *NPHS2* в Европе в когорте пациентов с поздней манифестацией НС [514], однако протеинурия двух обследованных нами детей с гомозиготным генотипом *c.868G>A*, *p.V290M/c.868G>A*, *p.V290M* манифестировала в возрасте одного месяца и двух лет, а протеинурия двух детей с компаунд-гетерозиготными генотипами *c.538G>A*, *p.V180M/c.868G>A*, *p.V290M* и *c.868G>A*, *p.V290M/c.275G>C*, *p.G92A* манифестировала с рождения и в один месяц соответственно, что не позволяет связать этот патогенный вариант с поздним дебютом болезни. Еще одной мажорной российской мутацией, встретившейся у 3 (13,6%) пациентов на 4 (9,1%) аллелях, можно считать мутацию *c.413G>A*, *p.R138Q*, которая считается мутацией основателя и превалирует у больных НС, тип II в большинстве европейских популяций [171].

Полиморфизм *c.686G>A*, *p.R229Q*, описанный ранее как «не нейтральный» полиморфизм у пациентов со СРНС в компаунд-гетерозиготном транс-положении с другими мутациями гена *NPHS2* [493, 611], встретился в нашем исследовании у 3 (13,6%) пациентов с НС, тип II на трех аллелях, при этом еще у одного обследованного ребенка, обладающего полиморфным вариантом *c.686G>A*, *p.R229Q* в гомозиготном состоянии, была выявлена мутация *c.737G>A*, *p.R246Q* гена *LMX1B*, описанная ранее у пациентов с изолированным СРНС [174]. Остальные дети с мутациями гена *NPHS2* были резистентны к проводимой терапии. Патогенность этого полиморфизма не до конца очевидна, в первую очередь из-за его высокой частоты, составляющей в среднем 3–5% среди европейцев [611], что скорее указывает на предрасположенность к развитию НС у носителей этого аллеля, чем на его причинную роль. Именно в связи с высокой частотой он отбирался нами дополнительно вне рамок стандартного биоинформатического алгоритма обсчета. Нам удалось установить, что полиморфизм *c.686G>A*, *p.R229Q* в ком-

паунд-гетерозиготном состоянии с другой мутацией гена *NPHS2* чаще встречается у пациентов с медленно прогрессирующим СРНС с манифестацией в более позднем возрасте, что сочетается с зарубежными данными [946]. Одной из наиболее важных задач молекулярной патофизиологии СРНС в ближайшем будущем будет являться определение истинной патогенности редкого полиморфизма *p.R229Q*, уменьшающего связывание подоцина с нефрином в опытах *in vitro* [952] с использованием клеточной биологии и животных моделей. Остальные мутации встретились в единственном числе (рис. 82). Медиана возраста манифестации НС у обследованных нами детей с мутациями гена *NPHS2* составила 3 месяца (с рождения до 7 лет). Биопсия была проведена 18 детям с мутациями гена *NPHS2*: у 13 (72,2%) детей гистологическая картина указывала на развитие ФСГС, у 4 (22,2%) – на минимальные изменения, у одного ребенка – на МПГН. Четверым детям биопсия не проводилась.

Среди всех обнаруженных нами 86 вариантов в 24 обследованных генах, содержащих мутации, нонсенс-мутация *c.259G>T, p.E87** – наиболее частый вариант (15,0%), при этом из 27 пациентов с врожденным НС она выявлена у 8 (29,6%) детей.

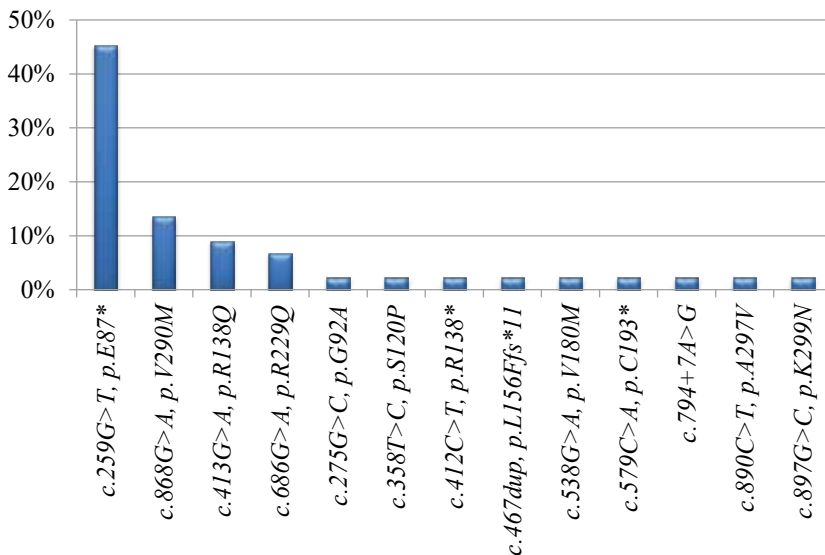


Рис. 82. Относительные частоты и спектр мутаций гена *NPHS2*, выявленные у российских детей с генетически обусловленным НС

Вторыми по относительной частоте среди всех исследованных генов, вызвавших развитие НС у обследованных нами детей, оказались мутации гена *WT1*, явившиеся причиной генетически обусловленных болезней почек, сопровождающихся симптомокомплексом НС у 13

(15,7%) пациентов (см. рис. 81). Из восьми (9,3%) различных вариантов гена *WT1* лишь два варианта (25,0%) не были описаны в базе HGMD ранее. Это два патогенных миссенс-варианта: *c.1217G>A* (PS2, PM2, PP3, PP4) и *c.1311T>G* (PS1, PM1, PM2, PP3, PP4), вызывающие замены аминокислотных остатков: *p.R406K* и *p.F437L* соответственно, и являющиеся синглтонами. При этом в базе HGMD существует описание патогенных вариантов двух соседних нуклеотидов того же кодона *c.1309T>C* и *c.1310T>G*, приводящих к заменам *p.F437L* [848] и *p.F437C* [857] у пациентов с НС. Наиболее частой мутацией у российских детей с НС, тип 4 оказалась сплайсинговая мутация *c.1447+5G>A* [882], описанная ранее у пациентов с НС [1000], а также у пациентов с синдромами Фрайзера [532] и Дениса–Драша [647]. Она встретилась у 4 (30,8%) неродственных пациентов: у одного – с синдромом Фрайзера, у второго – с синдромом Дениса–Драша и у двоих несиндромальных детей – с СРНС. Два ребенка из этих четырех проживают в Челябинской области, а два других – в Волгоградской и Тамбовской областях. Сплайсинговая мутация *c.1447+4C>T*, расположенная в соседнем нуклеотиде, также описанная ранее у пациентов с НС [1000], синдромами Фрайзера [532] и Дениса–Драша [396], встретилась у двух (15,4%) детей с СРНС и синдромом Фрайзера из Вологодской области и Республики Тыва. Патогенный вариант *c.1399C>T*, *p.R467W*, описанный ранее у детей с СРНС [1000] и синдромом Дениса–Драша [724] также встретился у двух неродственных детей с СРНС и нефробластомой из Тверской области и Ставропольского края. Эти три варианта можно считать мажорными для российских детей с НС, тип 4. Остальные мутации встретились в единственном числе (рис. 83).

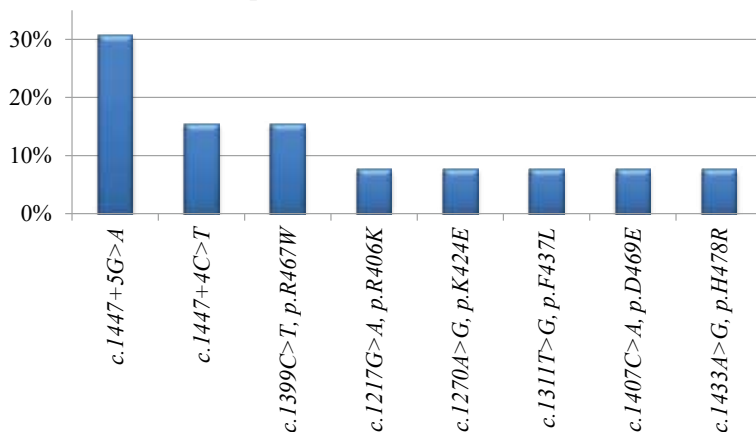


Рис. 83. Относительные частоты и спектр выявленных мутаций гена *WT1* у российских детей с генетически обусловленными проявлениями симптомокомплекса НС



У пациента с мутацией *c.1270A>G*, *p.K424E* гена *WT1*, описанной ранее у больных СРНС, также обнаружился миссенс-вариант *c.2869G>T*, *p.G957W* гена *INF2*, являющийся синглтоном. Однако для пациентов с мутациями гена *INF2*, являющимися причиной развития ФСГС, тип 5, характерна манифестация болезни в подростковом или взрослом возрасте, тогда как первый эпизод протеинурии нашего пациента был зафиксирован в возрасте 1,5 года, а ФСГС был установлен в результате биопсии, проведенной в возрасте 2 лет. Поэтому, по всей видимости, обнаруженный нами вариант гена *INF2* не является причинным, а скорее может играть модифицирующую роль в развитии клинической картины болезни ребенка.

Не удалось обнаружить корреляции определенных мутаций гена *WT1* с развитием того или иного фенотипа. Так, у детей с синдромом Фрайзера были выявлены патогенные варианты *c.1432+4C>T* и *c.1432+5G>A*, тогда как у ребенка с синдромом Дениса–Драша была найдена мутация *c.1432+5G>A*, а у ребенка с нефробластомой – мутация *c.1399C>T*, *p.R467W*. У всех 13 детей с мутациями гена *WT1* НС манифестировал с протеинурии. Медиана возраста дебюта НС составила 12 месяцев с разбросом значений с рождения до 8 лет и 8 месяцев. Для 11 пациентов с мутациями гена *WT1* известна гистологическая картина, которая также преимущественно описывает случаи ФСГС: семеро (63,6%) детей с ФСГС, трое (27,3%) с НСМИ, один (9,1%) – с IgA-нефропатией, что в целом подтверждается зарубежными данными [186]. Однако существуют и другие работы, на основании которых предлагается не включать в молекулярно-генетические исследования пациентов с IgA-нефропатией, доказанной на гистологическом уровне, так как считается маловероятным выявление мутаций у таких пациентов [150]. Все обследованные нами дети с мутациями гена *WT1* демонстрируют стойкую резистентность к иммуносупрессивной терапии. Ранняя молекулярная диагностика НС особенно актуальна для детей с мутациями гена *WT1*, так как для некоторых из них существует риск развития гонадобластомы [226].

Следует отметить, что 92,3% мутаций гена *WT1*, обнаруженных нами, расположены в экзонах 8 и 9, а также в интроне 9, что подтверждается зарубежными данными, в которых также отмечается преимущественное расположение мутаций гена *WT1* в этих областях [151]. В связи с этим алгоритм генетической диагностики НС у российских детей предлагается дополнить исследованием экзонов 8 и 9 гена *WT1* с прилегающими интронными областями, расширив при этом диапазон дебюта болезни до 12 месяцев.

На третьем месте по относительной частоте оказались варианты гена *NPHS1*, обусловившие развитие врожденного НС у 7 (8,4%) детей

(см. рис. 81). Среди выявленных нами 11 (12,8%) различных мутаций гена *NPHS1*, пять (45,5%) вариантов не были описаны в базе данных HGMD ранее. Это два вероятно патогенных варианта: *c.1598T>C* (PM1, PM2, PP3, PP4) и *c.1673G>T* (PM2, PM5, PP3, PP4), приводящие к заменам аминокислотных остатков *p.L533P* и *p.R558L*, патогенная дупликация *c.3548dup* (PVS1, PM2, PP4), приводящая к преждевременной термации трансляции *p.Y1183**, патогенная делеция *c.3286+1_3286+6del* (PVS1, PM2, PP4) и патогенный сплайсинговый вариант *c.1316-1G>A* (PVS1, PM2, PP4), затрагивающие канонические сайты сплайсинга. Варианты *c.1673G>T*, *p.R558L* и *c.1316-1G>A* являются синглтонами. Наиболее частой мутацией, встретившейся у трех (50%) пациентов из различных федеральных округов в гетерозиготном состоянии, оказалась нонсенс-мутация *c.3478C>T*, *p.R1160**, описанная ранее у пациентов с врожденным НС финского типа [600]. Второй по относительной частоте оказалась также нонсенс-мутация *c.3325C>T*, *p.R1109**, выявленная нами у одного ребенка в гомозиготном состоянии и описанная ранее у пациентов с врожденным НС [1000]. Остальные мутации встретились с долями менее 10% (рис. 84).

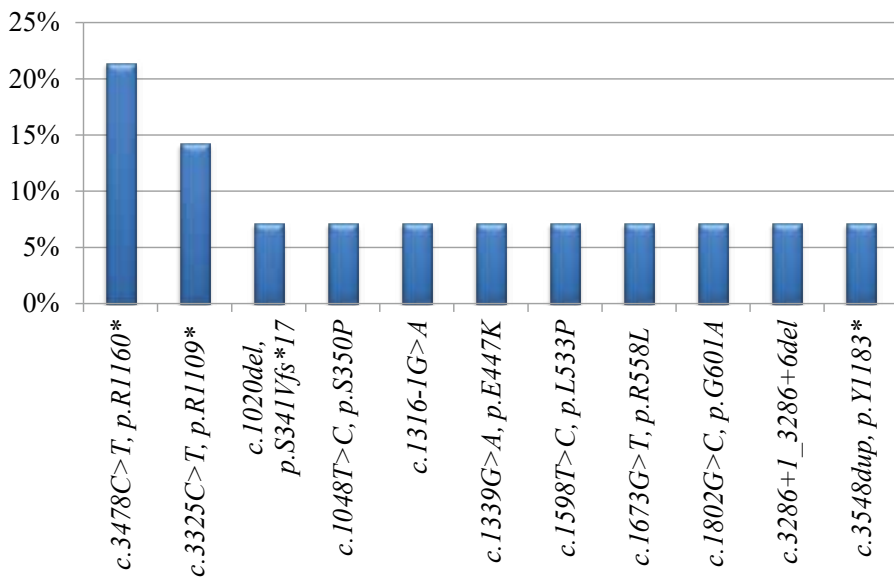


Рис. 84. Относительные частоты и спектр выявленных мутаций гена *NPHS1* у российских детей с генетически обусловленным врожденным НС

У шести детей с мутациями гена *NPHS1* протеинурия манифестировала с рождения, у седьмого – первый эпизод был зафиксирован в возрасте одного месяца, что подтверждает врожденный характер НС,

вызываемый мутациями в этом гене. Двое детей, биаллельный генотип которых был представлен нонсенс-вариантами, либо вариантами, приводящими к сдвигу рамки считывания, достигли терминальной стадии ХПН до двухлетнего возраста. Гистологическая картина, характеризуемая ФСГС, известна лишь для трех пациентов с мутациями гена *NPHS1*. Остальным детям с врожденным СРНС, вызванным патогенными вариантами гена *NPHS1*, биопсия не проводилась.

Среди пяти (5,8%) различных вариантов гена *CLCN5*, выявленных нами у 5 (6,0%) неродственных пациентов с клиническими проявлениями неполного НС (см. рис. 81), все обнаруженные варианты не были описаны ранее и являлись синглтонами. Это три патогенных нонсенс-варианта *c.275G>A, p.W92** (PVS1, PM2, PP4), *c.384G>A, p.W128** (PVS1, PM2, PP4) и *c.469G>T, p.E157** (PVS1, PM2, PP4), один вероятно патогенный вариант, который может оказывать влияние на сплайсинг *c.415+3A>G* (PS2, PM2, PP4), и одна патогенная делеция, приводящая к сдвигу рамки считывания *c.1574_1575del, p.F525Yfs*3* (PVS1, PM2, PP4). Все пять мутаций были выявлены в гемизиготном состоянии у двух детей из Москвы, по одному – из Кемеровской области, Красноярского края и Пермского края и продемонстрировали равномерное распределение относительных частот. Известно, что мутации гена *CLCN5* приводят к развитию болезни Дента, наследуемого по X-сцепленному рецессивному типу. У трех мальчиков мутации были унаследованы по материнской линии, у двух других – возникли спонтанно. Более половины случаев болезни Дента, вызываемой мутациями генов *CLCN5* и *OCRL*, сопровождаются протеинурией [958], которая, в свою очередь, у некоторых детей сопровождается гипоальбуминемией, демонстрируя картину неполного НС, тогда как некоторые пациенты демонстрируют картину полного НС, резистентного к терапии [1006]. Пациенты с мутациями гена *CLCN5* характеризовались различным возрастом манифестации болезни от 2 месяцев до 6 лет с медианой 8 месяцев. Трем детям была проведена нефробиопсия, в результате которой у двух детей был установлен ФСГС, а у третьего – НСМИ.

Нуклеотидные варианты гена *COL4A5* были выявлены у пяти (6,0%) детей из неродственных семей (см. рис. 81). При этом два (40,0%) варианта из пяти (5,8%) обнаруженных не были описаны ранее в базе данных HGMD. Это патогенный сплайсинговый вариант *c.936+2T>A* (PVS1, PM2, PP4), являющийся синглтоном, а также вероятно патогенный миссенс-вариант *c.2362C>T, p.R788C* (PM1, PM2, PP3, PP4). Все пять найденных вариантов встретились в единичном гемизиготном состоянии у мальчиков с клиническими проявлениями НС. Мутации гена *COL4A5* приводят к развитию синдрома Альпорта, наследуемого в соответствии с X-сцепленным доминантным типом.



У двух детей болезнь манифестировала с эпизода гематурии, у трех – с протеинурии с медианой 2 года и 4 месяца (с разбросом от 1 года до 5 лет). Гистологическая картина четырех (80%) мальчиков характеризовалась ФСГС, а пятого – МПГН, что, в целом, характерно для пациентов с мутациями гена *COL4A5* [610].

Нуклеотидные варианты гена *NUP93* были обнаружены у четырех (4,8%) детей с НС из неродственных семей, проживающих в различных регионах России (см. рис. 98). При этом три (50,0%) варианта из шести (7,0%) обнаруженных не были описаны ранее в базе данных HGMD. Это патогенный нонсенс-вариант *c.880C>T*, *p.R294** (PVS1, PM2, PP4), а также два патогенных варианта *c.2137-1G>C* (PVS1, PM2, PP4) и *c.1782+1G>A* (PVS1, PM2, PP4), затрагивающие канонические сайты сплайсинга. Все три варианта выявлены в компаунд-гетерозиготном состоянии с описанными ранее патогенными вариантами: *c.1772G>T*, *p.G591V*, считающейся славянской мутацией и описанной в самой первой публикации по этому гену [178], а также *c.727A>T*, *p.K243** и *c.2137-18G>A*, описанными совсем недавно [814]. У всех четырех детей НС синдром манифестировал с эпизодов протеинурии в возрасте от 1 года и 7 месяцев до 6 лет и 6 месяцев (медиана 2 года и 3 месяца). У двух пациентов болезнь прогрессировала до ХБП5 и ХБП4 в течение 1,5 и 3 лет соответственно, двое других демонстрируют более мягкое течение заболевания (ХБП2). Гистологическая картина трех (75%) пациентов с мутациями гена *NUP93* характеризуется ФСГС, четвертого – НСМИ, что может быть связано с ранней биопсией почки, проведенной в самом начале болезни. В базе данных OMIM мутации гена *NUP93* описаны как причины развития НС, тип 12 у пациентов, частично отвечающих на терапию стероидами, кроме того, один из четырех обследованных нами пациентов отвечает на терапию циклоспорином А, как и один из пациентов, описанных ранее [178].

Особого внимания среди трех (3,6%) пациентов с мутациями гена *PLCE1* заслуживают двое мальчиков с гомозиготными мутациями *c.3346C>T*, *p.R1116** и *c.1146del*, *p.S383Qfs*5*, описанными ранее [435], ДМС, выявленным после проведения нефробиопсии, резистентностью к любой проводимой терапии и со стремительным прогрессированием болезни до терминальной стадии ХПН, что также описано для пациентов с гомозиготными и компаунд-гетерозиготными мутациями, преждевременно прерывающими синтез кодируемого белка, другими авторами [822]. Среди четырех (4,7%) различных вариантов гена *PLCE1*, выявленных нами, лишь один вариант не был описан ранее в базе данных HGMD. Это вероятно патогенный миссенс-вариант *c.5891G>T*, *p.R1964L* (PM2, PM3, PP3, PP4), являющийся синглтоном

и обнаруженный в компаунд-гетерозиготном состоянии с мутацией *c.1477C>T*, *p.R493**, описанной ранее [440]. У двух мальчиков, описанных выше, болезнь манифестировала с эпизодов протеинурии, зафиксированных в возрасте 4 месяцев, тогда как у третьего ребенка первый эпизод протеинурии отмечен в возрасте 1 года и 5 месяцев, а клиническая картина характеризуется неполным НС, ХБП1 и ФСГС. Вероятно, гетерозиготный миссенс-вариант может определять более мягкое течение болезни у этого ребенка по сравнению со стремительным прогрессированием НС у двух детей с биаллельными вариантами, терминирующими синтез кодируемого белка.

Нуклеотидные варианты гена *COL4A3* были выявлены у трех (3,6%) детей с НС из неродственных семей (см. рис. 81). При этом два (66,7%) варианта из трех (3,5%) обнаруженных не были описаны ранее в базе данных HGMD. Это патогенный вариант *c.324+2T>A* (PVS1, PM2, PP4), нарушающий канонический сайт сплайсинга и выявленный в гомозиготном состоянии у девочки, родившейся от родителей, состоящих в близком родстве, и патогенная дупликация *c.284dup* (PVS1, PM2, PP4), приводящая к сдвигу рамки считывания *p.S96Kfs*34*, обнаруженная в компаунд-гетерозиготном состоянии с мутацией *c.1006G>T*, *p.G336C*, описанной ранее [323]. Обе новые мутации являются синглтонами. Патогенные варианты гена *COL4A3* вызывают синдром Альпорта, наследуемый как по аутосомно-рецессивному, так и по аутосомно-доминантному типу. У всех детей болезнь манифестировала с эпизодов гематурии, впервые выявленной в возрасте от 4 месяцев до 2 лет и 11 месяцев с медианой 1 год и 7 месяцев. Исследование семейного анамнеза, а также выявление генетических причин синдрома Альпорта в Италии продемонстрировало около трети доминантных случаев болезни [323], для которых характерна гистологическая картина тонких базальных мембран. У обоих описываемых нами пациентов, имеющих в своем геноме рецессивные мутации, нефробиопсия также показала болезнь тонких базальных мембран.

Наше исследование подтвердило, что синдром Альпорта выявляется приблизительно у 10% больных НС, даже при отсутствии сенсоневральной тугоухости и типичных морфологических аномалий базальной мембраны [620, 674].

Нуклеотидные варианты гена *LMX1B* были обнаружены у двух (3,6%) детей с изолированным СРНС без гипоплазии надколенника и ногтевых пластин, характерных для синдрома NailPatella, вызываемым подавляющим большинством мутаций этого гена, описанных в базе данных HGMD. При этом у обоих детей, протеинурия и/или гематурия которых дебютировала в возрасте 3,5 месяцев, была выявлена гетерозиготная мутация *c.737G>A*, *p.R246Q*, описанная ранее

лишь у пациентов с изолированным СРНС [857, 1006, 1000]. По всей видимости, мутация *c.737G>A*, *p.R246Q* относится к наиболее частым мутациям гена *LMX1B* и распространена в различных регионах мира, что подтверждается и нашим исследованием, которое показало, что один из пациентов проживает в Тюменской области, другой – в Приморском крае. Результаты нефробиопсии двух детей продемонстрировали ФГС. В обоих случаях обнаруженные патогенные варианты гена *LMX1B* возникли спорадически.

Три варианта (3,5%) гена *SMARCAL1* были обнаружены у двух (2,4%) детей (см. рис. 81). При этом вероятно патогенный вариант *c.1710+5G>A* (PM2, PM3, PP3, PP4), который может приводить к нарушению сплайсинга, не был описан ранее. У двух детей из Саратовской и Ростовской областей на двух (50,0%) аллелях была выявлена нонсенс-мутация *c.2542G>T*, *p.E848**, описанная ранее у пациентов с синдромом Шимке и различным географическим происхождением, как одна из наиболее частых мутаций [163]. У обоих пациентов болезнь манифестировала с протеинурии, выявленной впервые в возрасте от 11 месяцев до 2 лет и 6 месяцев с медианой 1 год и 8 месяцев. В результате проведенной нефробиопсии у обоих детей был обнаружен ФГС, что характерно для детей с синдромом Шимке, описанных ранее [828].

Кроме того, по два ребенка с НС имели мутации генов: *COQ6*, *CRB2*, *INF2* и *OCRL*, тогда как мутации генов: *ACTN4*, *CUBN*, *ITGA3*, *LAMB2*, *TRPC6*, *COQ2*, *CFH*, *KANK2*, *NUP205* и *PTPRO* были выявлены у единичных пациентов с симптомокомплексом НС (см. рис. 81). Особого внимания среди пациентов с мутациями в этих генах заслуживает девочка с гетерозиготной делецией гена *INF2* и клиническими проявлениями СРНС и ШМТ, а также трое детей с мутациями генов *COQ2* и *COQ6*. Идентификация причинной мутации может в некоторых случаях не только скорректировать проводимое лечение, но и изменить его кардинальным образом [35, 36]. Например, обнаружение мутаций в генах *COQ2* и *COQ6*, кодирующих ферменты биосинтеза коэнзима Q10, позволило облегчить состояние больных детей, проводя терапию коэнзимом Q10, поскольку частичный ответ на лечение коферментом Q10 был описан ранее у детей с СРНС и мутациями генов *COQ2* и *COQ6* [425, 679]. Известно, что пациенты с мутациями генов *CUBN* и *TRPC6* могут поддаваться лечению витамином B12 и ингибиторами кальциневрина [841] соответственно, однако дети, включенные в наше исследование, не ответили на такое лечение. В ходе нашего исследования была также обнаружена новая гомозиготная синонимичная мутация в каноническом сайте сплайсинга *c.1890G>A*, *p.Q630Q* в гене *LAMB2*, мутации которого приводят как к развитию тяжелого синдрома Пир-



сона, так и к НС, тип 5, у четырехлетнего мальчика с задержкой физического развития, микрокорией, косоглазием, катарактой, глаукомой, нистагмом и кистами правой почки. Особенная тяжесть клинической картины детей с болезнью Пирсона, погибающих, как правило, в первые недели жизни, может являться одной из причин отсутствия пациентов с этим синдромом в когорте обследованных нами больных.

Суммарно удалось выявить 86 вариантов в 24 исследованных генах. Среди них чуть более половины, а именно 49 (57,0%) вариантов составляли миссенс-мутации, кроме того, было обнаружено 15 (17,4%) мутаций, оказывающих влияние на сплайсинг, 13 (15,1%) нонсенс-мутаций, 5 (5,8%) небольших делеций, три из которых приводят к сдвигу рамки считывания, и 4 (4,7%) небольшие вставки, три из которых сдвигают рамку считывания, а четвертая образует стоп-кодон (рис. 85). При этом нонсенс-мутации и мутации, сдвигающие рамку считывания, были выявлены у 33 (39,8%) пациентов.

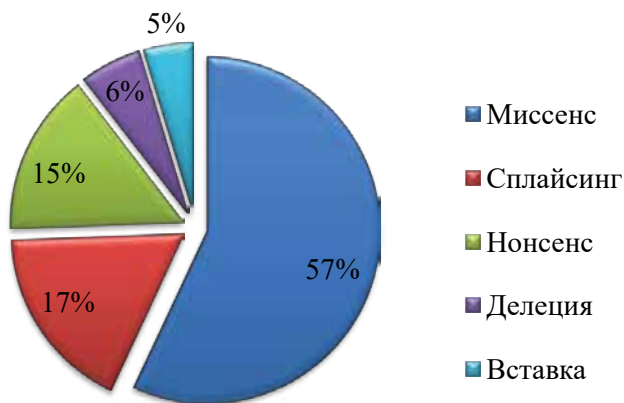


Рис. 85. Доли различных типов мутаций, выявленных у 83 российских детей с генетически обусловленным НС

Суммируя данные по всем обследованным пациентам, важно отметить, что дети, имеющие в своем геноме мутации, достоверно ($p=0,007$) чаще развивают терминальную стадию ХПН по сравнению с детьми без мутаций (табл. 57).

Таблица 57. Расчет ассоциации тХПН с наличием мутаций у российских детей с НС

тХПН	Мутации		р-значение (критерий Фишера)
	нет	есть	
Нет	92	74	0,007
Есть	1	9	

Таким образом, дети с выявленными вариантами в изученных нами генах обладают повышенным риском развития тХПН по сравнению с детьми, не имеющими мутаций ОШ=11,1 (ДИ 1,5–494,5).

3.1.3. ГЕНОТИП-ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ КОРРЕЛЯЦИИ, ВЫЯВЛЕННЫЕ ПРИ ОПИСАНИИ НОВЫХ ВАРИАНТОВ В ИЗУЧЕННЫХ ГЕНАХ

В общей сложности было выявлено 40 нуклеотидных вариантов, не описанных ранее в международной базе данных HGMD (табл. 58), что составляет менее половины (46,5%) всех обнаруженных нами вариантов (рис. 86), при этом 34 (85,0%) варианта являются синглтонами.

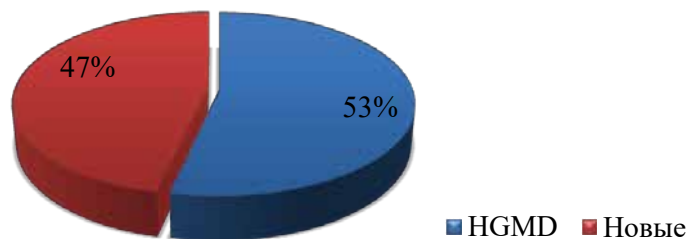


Рис. 86. Соотношение выявленных вариантов генов, описанных и не описанных ранее в международной базе данных HGMD, у детей с генетически обусловленным НС

Таблица 58. Патогенные, вероятно патогенные нуклеотидные варианты, а также варианты с неизвестной патогенностью, не аннотированные ранее в международной базе данных HNSID, выявленные у детей с синдромом комплекса НС. Корреляции генотипа и фенотипа

Ген	Нуклеотидный, аминокислотный вариант 1	Описание	Нуклеотидный, аминокислотный вариант 2	Описание	Возраст дебюта, мес	Возраст постановки диагноза, мес	Результат нефробиопсии	Фенотип
ACTN4	c.2038A>G, p.N680D	VUS (PM2, PP3, PP4)	-		16	114	НСМИ	СРНС, ХВП 1-2
SLCN5	c.384G>A, p.W128*	Патогенный	-		2	19	НСМИ	НС, ХВП 1
SLCN5	c.1574_1575del, p.F525Yfs*3	Патогенный	-		72	92	-	НС, ХВП 2, гематурия, оксалурия, тубулопатия
SLCN5	c.275G>A, p.Trp92*	Патогенный	-		24	84	МППН	НС, ХВП 1, синдром Фанкони неполный, гиперфосфатурия
SLCN5	c.415+3A>G	Вероятно патогенный	-		8	200	ФСГС	НС, ХВП 3, ХПН 1, АГ, задержка роста
SLCN5	c.469G>T, p.E157*	Патогенный	-		3	18	-	НС, ХВП1, гипоплазия ногтей
SOQ2	c.571-1G>A	Патогенный (PVSI, PM2, PP4)	c.683A>G, p.N228S	[900]	24	27	ФСГС	СРНС, ХВП 1, АГ



Продолжение таблицы 58

Ген	Нуклеотидный вариант 1	Описание	Нуклеотидный вариант 2	Описание	Возраст дебюта, мес	Возраст постановки диагноза, мес	Результат нефробиопсии	Фенотип
COQ6	c.983C>A, p.A328D	VUS (PM2, PP3, PP4)	c.983C>A, p.A328D	VUS (PM2, PP3, PP4)	27	37	ФСГС	СРНС, ХБП 1
COL4A3	c.324+2T>A	Патогенный	c.324+2T>A	Патогенный	4	177	Болезнь тонких базальных мембран	Неполный НС, гематурия, ХБП 3, АГ, тугоухость
COL4A3	c.284dup, p.S96Kfs*34	Патогенный	c.1006G>T, p.G336C	[323]	35	67	Болезнь тонких базальных мембран	Неполный НС, гематурия, ХБП 1, тугоухость
COL4A5	c.2362C>T, p.R788C	Вероятно патогенный	-		24	28	ФСГС	СРНС, ХБП 1, АГ, катаракта
COL4A5	c.936+2T>A	Патогенный	-		28	108	ФСГС	СРНС



CRB2	<i>c.3449G>A, p.C1150Y</i>	VUS (PM2, PP3, PP4)	<i>c.3559A>C, p.T1187P</i>	VUS (PM2, PP3, PP4)	1	60	ФСГС	Неполный НС, ХБП 1, поликистоз почек
INF2	<i>c.327_344del, p.M109_G114del</i>	Патогенный (PS2, PM2, PM4, PP4)	-		117	129	ФСГС	СРНС, ХБП 1, ШМТ
INF2	<i>c.2053A>G, p.I685V</i>	VUS (PVS1, PP3, PP4, BS1)	-		163	179	ФСГС	СРНС, ХБП 1
ITGA3	<i>c.2281C>T, p.Q761*</i>	Патогенный (PVS1, PM2, PP4)	-		18	143	ФСГС	СЗНС, ХБП
LAMB2	<i>c.1890G>A, p.Q630Q</i>	Патогенный (PVS1, PM2, PP4)	<i>c.1890G>A, p.Q630Q</i>	Патогенный (PVS1, PM2, PP4)	6	51	-	СРНС, гематурия, ХБП2, ЗФР, микрокория, косоглазие, нистагм, поликистоз почки
NPHS2	<i>c.686G>A, p.R229Q</i>	[591]	<i>c.897G>C, p.K299N</i>	Вероятно патогенный	3	14	ФСГС	СРНС, ХБП 1
NPHS2	<i>c.275G>C, p.G92A</i>	Патогенный	<i>c.868G>A, p.V290M</i>	[507]	1	24	-	СРНС, ХБП 1, АГ



Продолжение таблицы 58

Ген	Нуклеотидный вариант 1	Описание	Нуклеотидный вариант 2	Описание	Вероятно патогенный	Возраст дебюта, мес	Возраст постановки диагноза, мес	Результат нефробиопсии	Фенотип
NPHS2	c.358T>C, p.S120P	[569]	c.1027C>T, p.R343S	Вероятно патогенный	Вероятно патогенный	26	80	-	СРНС, ХБП 1, недостаточность ТК
NPHS2	c.259G>T, p.E87*	[943]	c.794+7A>G	Вероятно патогенный	Вероятно патогенный	1	н/д	н/д	СРНС, гематурия
NPHS2	c.686G>A, p.R229Q	[591]	c.944C>T, p.T315I	Вероятно патогенный	Вероятно патогенный	53	57	НСМИ	СРНС, ХБП 1, АГ, кагаракта
NPHS2	c.413G>A, p.R138Q	[861]	c.579C>A, p.C193*	Вероятно патогенный	Вероятно патогенный	89	97		СРНС, гематурия, ХБП 1, АГ
NPHS1	c.1673G>T, p.R558L	Вероятно патогенный	c.3548dup, p.Y1183*	Вероятно патогенный	Вероятно патогенный	0,2	3	-	СРНС, ХБП 1, гематурия, нефромегалия, анемия
NPHS1	c.1316-1G>A	Вероятно патогенный	c.3478C>T, p.R1160*	Вероятно патогенный	[1000]	с рождения	1		СРНС, ХБП1, АГ
NPHS1	c.1598T>C, p.L533P	Вероятно патогенный	c.3286+1_3286+6del	Вероятно патогенный	Вероятно патогенный	с рождения	1	-	СРНС
NUP93	c.1772G>T, p.G591V	[178]	c.2137-1G>C	Вероятно патогенный	Вероятно патогенный	24	26	НСМИ	СРНС, тХПН, диализ, экзогенный гиперкортицизм



NUP93	c.1772G>T, p.G591V	[178]	c.1782+IG>A	Патогенный	30	171	ФСГС	СРНС, ХБП 2, АГ, миопия, кардиозофагальный пролапс
NUP93	c.2137-18G>A	[814]	c.880C>T, p.R294*	Патогенный	78	82	ФСГС	СРНС, ХБП4, АГ
OCRL	c.479_482dup, p.A162Ffs*27	Патогенный (PV51, PM2, PP4)	-		4	14	НСМИ	Неполный НС, ХБП 1
OCRL	c.479_482dup, p.A162Ffs*27	Патогенный (PV51, PM2, PP4)	-		12	24	НСМИ	Неполный НС, нефрокальциноз, ХБП 1, остеохондроза
PLCE1	c.1477C>T, p.R493*	[440]	c.589IG>T, p.R1964L	Вероятно патогенный	17	24	ФСГС	Неполный НС, ХБП 1
PTPRO	c.1535G>A, p.R512K	VUS (PM2, PP3, PP4)	c.2604G>C, p.R868S	VUS (PM2, PP3, PP4)	9	67	НСМИ	Неполный НС, ХБП 1
SMAR CAL1	c.2542G>T, p.E848*	[163]	c.1710+5G>A	Вероятно патогенный	11	31	ФСГС	СРНС, ХБП 4-5, паховая грыжа, кагаракта
TRPC6	c.2778A>T, p.Q926H	VUS (PM2, PP3, PP4)	-		60	95	ФСГС	СРНС, ХБП 1, АГ, анемия
WT1	c.1311T>G, p.F437L	Патогенный	-		24	84	IgA-нефропатия	СРНС, ХБП 1, гематурия
WT1	c.1217G>A, p.R406K	Патогенный	-		104	132	ФСГС	СРНС, ХБП 1, гематурия, миопия, катаракта

Примечание. Все выявленные генетические отличия от референсной последовательности ДНК были отфильтрованы по частоте минорного аллеля, не превышающей 0,5% для рецессивного типа наследования и 0,01% – для доминантного. Дальнейший анализ вариантов проводился в соответствии с российским Руководством по интерпретации данных последовательности ДНК человека [51], что отражено в таблице для новых генетических вариантов, не описанных в этой главе выше (если неопубликованный вариант выявлен в компаунд-тетерозиготном положении с описанным, то в столбце «Описание» приведена ссылка на публикацию). VUS – вариант с неизвестной патогенностью.



Значительная доля неописанных вариантов свидетельствует о высокой гетерогенности и слабой изученности генетических причин развития НС у российских детей [834]. В широкомасштабных исследованиях генетических причин развития НС у детей зарубежными специалистами также обращает на себя внимание высокий процент новых мутаций [150, 822, 949].

3.1.4. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАЦИЙ ИЗУЧЕННЫХ ГЕНОВ В СООТВЕТСТВИИ С ЛОКАЛИЗАЦИЕЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫМ ВКЛАДОМ ИХ ПРОДУКТОВ

Гены, содержащие мутации, были классифицированы в соответствии с функциональной принадлежностью их продуктов различным компонентам подоцитов (рис. 87) [373].



Рис. 87. Распределение мутаций изученных генов в соответствии с локализацией и функциональным вкладом их продуктов

Примечание. Гены были сгруппированы на основании локализации и функционального вклада их продуктов в различные компоненты подоцитов по шести группам (гены, кодирующие белки диафрагмы; гены, кодирующие ядерные белки; гены, кодирующие цитоскелетные белки; гены, кодирующие белки базальной мембраны клубочков; гены, кодирующие митохондриальные белки, а также остальные гены, мутации в которых были выявлены у детей с симптомокомплексом НС).

Почти у половины (35/42,2%) обследованных нами пациентов были выявлены варианты генов, кодирующих белки щелевой диафрагмы; варианты генов, кодирующих ядерные белки, были обнару-

жены у 22/26,5% пациентов; гены, кодирующие компоненты клубочковой базальной мембраны – у 8/9,6% детей; гены, кодирующие белки актинового цитоскелета, претерпели изменения у 4/4,8% больных детей; мутации генов, кодирующих белки, локализующиеся в митохондриях подоцитов, содержали мутации у 3/3,6% детей. Преобладание мутаций генов, кодирующих белки, формирующие щелевую диафрагму между ножками подоцитов, – наиболее частая причина моногенных болезней, сопровождающихся симптомокомплексом НС, что также было описано в зарубежной литературе [247].

3.1.5. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ОБНАРУЖЕННЫХ МУТАЦИЙ НА ВОЗРАСТ МАНИФЕСТАЦИИ НЕФРОТИЧЕСКОГО СИНДРОМА

Оценка распределения этиопатогенетических причин развития болезни в зависимости от возраста манифестации первых клинических симптомов в различных возрастных группах показала, что наибольшее число пациентов с этиологическими мутациями было выявлено в группе детей с манифестацией протеинурии в течение первых трех месяцев с момента рождения, то есть в группе пациентов с врожденным НС (рис. 88).

Мутации генов *NPHS1* (7/100%), *NPHS2* (14/63,6%) и *WT1* (5/38,5%) были обнаружены в этой группе у 26 детей, кроме того, еще у одной девочки, протеинурия которой манифестировала в возрасте одного месяца, были обнаружены варианты гена *CRB2*. То есть 32,5% детей с выявленными мутациями имели врожденный НС, при этом лишь у двух пациентов с СРНС, дебютировавшем в возрасте от 0 до 3 месяцев, не удалось обнаружить генетическую основу болезни. В отличие от многоцентрового зарубежного исследования команды ученых во главе с Хильдебрандтом [822], продемонстрировавших преимущественную встречаемость мутаций гена *NPHS1* у пациентов с врожденным НС и наибольшую долю мутаций гена *NPHS2* у пациентов в возрасте от 1 года до 18 лет, в нашем исследовании именно мутации гена *NPHS2* вызвали врожденный НС более чем у половины детей с первым эпизодом протеинурии, зафиксированным от 0 до 3 месяцев. Вероятно, эти различия могут быть связаны с незначительным числом выявленных нами пациентов с мутациями гена *NPHS1* и существенным числом пациентов с мутациями гена *NPHS2*, в частности, с патогенным вариантом *p.E87**, характерным для российской популяции детей с СРНС и достоверно ($p=0,001$) чаще встречающимся

среди пациентов с дебютом НС в возрасте до 3 месяцев по сравнению с любыми мутациями других генов, выявленными в ходе нашего исследования (табл. 59).

Таблица 59. Расчет ассоциации патогенного варианта *p.E87** гена *NPHS2* с возрастом дебюта НС у российских детей

Возраст манифестации, мес	Вариант <i>p.E87*</i> гена <i>NPHS2</i>		р-значение (критерий Фишера)
	есть	нет	
≤ 3	8	13	0,001
> 3	4	58	

Иными словами, наличие мутации *p.E87** гена *NPHS2* в геноме пациента с СРНС служит фактором повышенного риска ранней манифестации НС в возрасте до 3 месяцев ОШ=8,6 (ДИ 2,0–45,3). При этом необходимо отметить, что наличие любых мутаций, приводящих к преждевременной терминации трансляции, а также мутаций, нарушающих канонические сайты сплайсинга, чаще встречается у пациентов с дебютом болезни в первые 6 месяцев по сравнению с пациентами, болезнь которых манифестирует в любом другом возрасте ($p=0,012$) (табл. 60).

Таблица 60. Расчет ассоциации «количественных» мутаций, вызывающих НС, с возрастом дебюта болезни у российских детей

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

Таким образом, пациенты с НС, развившимся вследствие нонсенс-мутаций, мутаций со сдвигом рамки считывания, а также мутаций канонических сайтов сплайсинга, обладают повышенным риском раннего дебюта первых клинических признаков НС в возрасте до 6 месяцев ОШ=3,1 (ДИ 1,2–8,4) по сравнению с пациентами, у которых были обнаружены любые другие мутации изученных нами генов.

Из представленных на рис. 88 данных очевидно, что высота столбцов, характеризующая число пациентов с выявленными мутаци-

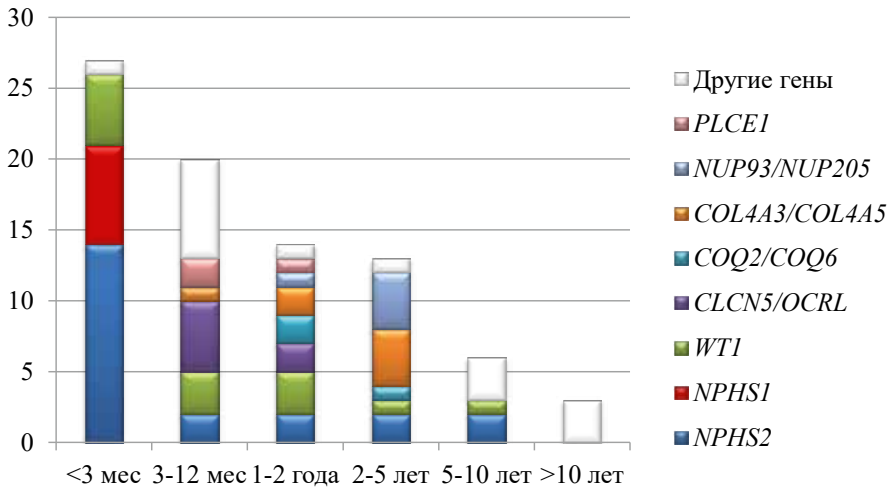


Рис. 88. Распределение генетических и возрастных особенностей дебюта НС у 83 детей с выявленными мутациями

Примечание. К разряду «другие гены» относятся гены, мутации которых встретились менее чем у трех пациентов с клиническими проявлениями НС. По вертикальной оси отложено число пациентов.

ями, постепенно уменьшается с увеличением возраста обследованных пациентов, что свидетельствует в пользу преимущественной генетической этиологии НС у пациентов с ранним дебютом первых клинических признаков заболевания. Другой важной корреляцией генотипа и фенотипа для пациентов с НС является различие между генами, мутации которых обуславливают рецессивное и доминантное наследование. Биаллельные мутации чаще встречаются при раннем начале заболевания, тогда как варианты генов, для которых характерен доминантный тип наследования, в том числе *INF2* и *TRPC6*, чаще вызывают заболевание в более позднем возрасте, что также подтверждается иностранными публикациями [822]. Исключение составляют мутации гена *WT1*, вызывающие дебют болезни в 85% изученных нами случаев в возрасте до двух лет.

Суммируя данные по всем обследованным пациентам с проявлениями НС, важно отметить, что первые клинические проявления НС у детей с выявленными мутациями достоверно ($p < 0,001$) раньше манифестируют по сравнению с детьми, страдающими НС и не имеющими в своем геноме мутаций (табл. 61).

Таблица 61. Расчет корреляции возраста манифестации НС с наличием мутаций изученных генов у российских детей с НС

Мутации	Число наблюдений	Возраст манифестации НС, мес	р-значение (критерий Манна-Уитни)
Есть	83	28 (0,03–180)	<0,001
Нет	93	59 (1–191)	

Примечание. Возраст манифестации НС представлен значениями медианы и квартилями распределения признаков (25–75%).

3.1.6. КОРРЕЛЯЦИЯ ВЫЯВЛЕННЫХ МУТАЦИЙ С ГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ КАРТИНОЙ НЕФРОТИЧЕСКОГО СИНДРОМА

Результаты нефробиопсии были получены и проанализированы у 67/83 (80,7%) пациентов, среди которых у 44 (65,7%) детей была обнаружена гистологическая картина, соответствующая ФСГС, у 15 (22,4%) пациентов – НСМИ, у 3 (4,5%) детей был выявлен МПГН, ДМС и болезнь тонких базальных мембран описаны у 2 (3,0%) пациентов, и лишь у одного ребенка была найдена IgA-нефропатия (рис. 89).

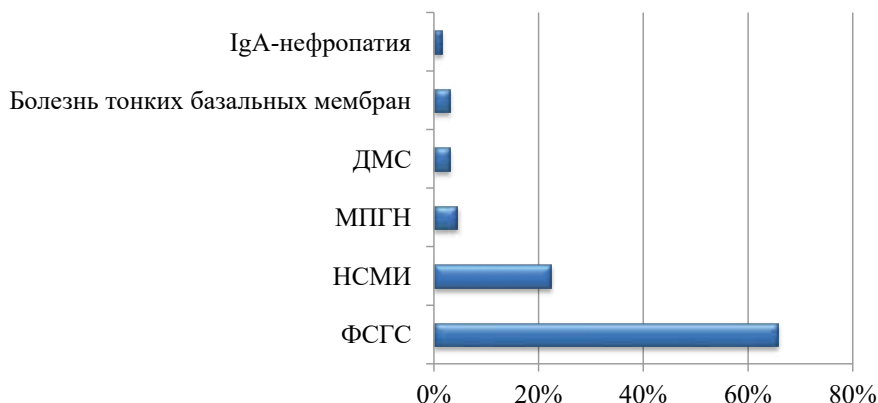


Рис. 89. Относительные частоты различных результатов нефробиопсии в группе из 67 обследованных пациентов с выявленными мутациями

Результаты нефробиопсии подтверждают значительное превалирование гистологической картины ФСГС среди пациентов с мутациями и клиническими проявлениями НС и в зарубежных исследованиях, при этом НСМИ зачастую переходит в ФСГС при прогрессировании болезни [949], что было продемонстрировано на примере двух обследованных нами больных с повторно проведенной нефробиопсией. Необходимо отметить, что два ребенка с ДМС имели ранний дебют и наибольшую скорость прогрессирования ХБП до терминальной стадии по сравнению с детьми, имеющими иную гистологическую картину, что подтверждает данные испанских коллег [731] и может способствовать прогнозированию течения болезни на основе раннего гистологического исследования.

На рис. 90 представлены данные, наглядно подтверждающие преимущественную встречаемость ФСГС у пациентов с мутациями

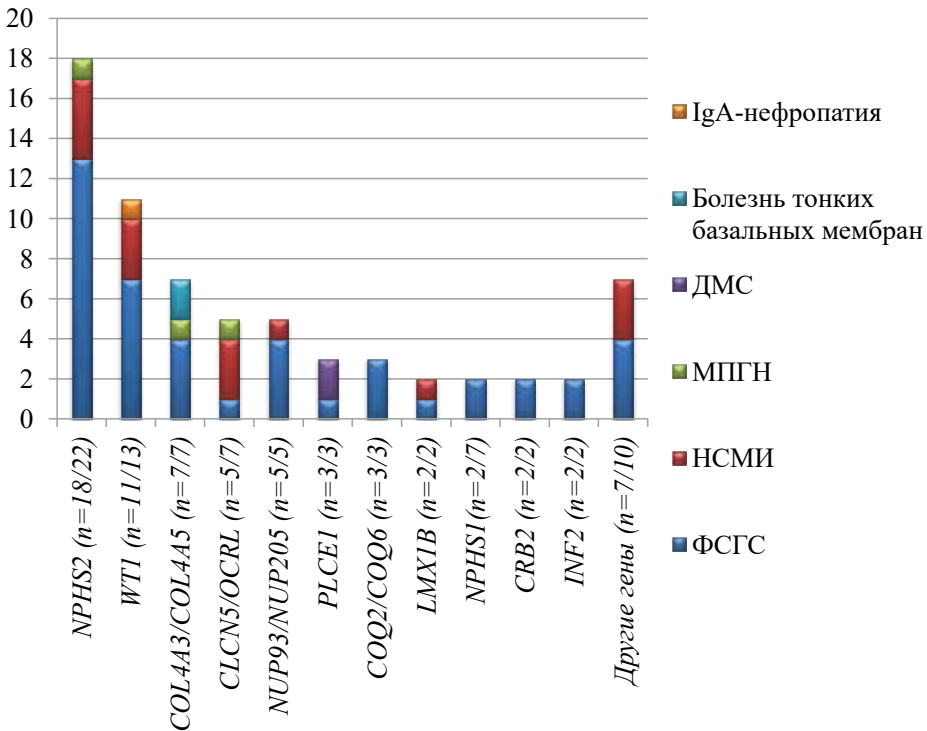


Рис. 90. Распределение генетических и гистологических особенностей развития НС у 67 обследованных пациентов с выявленными мутациями

Примечание. К разряду «другие гены» относятся гены, мутации которых были выявлены менее чем у двух пациентов с известными результатами нефробиопсии. По вертикальной оси отложено число пациентов.

подавляющего большинства изученных генов, при этом ДМС был обнаружен лишь у пациентов с гомозиготными мутациями гена *PLCE1*, преждевременно терминирующими синтез кодируемого белка, с быстрым прогрессированием болезни. Вероятно, что этот же результат нефробиопсии был бы выявлен и у других пациентов с врожденным НС и быстрым прогрессированием болезни, в том числе у пациентов с мутациями генов *WT1* и *NPHS1*, однако биопсия не была проведена в силу их раннего возраста и/или особой тяжести состояния.

Подсчитав число пациентов с различными гистологическими особенностями, имеющих в своем геноме мутации изученных нами генов и сравнив их с гистологической картиной детей с НС, не имеющих мутаций, становится очевидно, что различия в этих группах носят достоверный характер ($p < 0,001$), причем пациенты с мутациями обладают повышенным риском развития ФСГС по сравнению с детьми, мутации которых выявить не удалось ОШ=5,4 (ДИ 2,4–12,9) (табл. 62).

Таблица 62. Расчет ассоциации ФСГС с наличием мутаций изученных генов у российских детей с НС

ФСГС	Мутации		р-значение (критерий Фишера)
	Нет	Есть	
Нет	43	23	<0,001
Есть	15	44	

3.1.7. ОПТИМИЗАЦИЯ АЛГОРИТМА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ НЕФРОТИЧЕСКОГО СИНДРОМА

Полученные данные позволяют предложить оптимизацию алгоритма диагностики НС у российских детей, первый этап которого включает секвенирование кодирующих и прилегающих интронных областей гена *NPHS2*, а также экзонов 8 и 9 гена *WT1*, на которые в общей сложности приходится 41,0% всех выявленных мутаций обследованных нами пациентов. В случае невыявления этиопатогенетических причин НС на первом этапе, во второй этап генетической диагностики предлагается включить исследование таргетных областей

исследованных нами 57 генов методом высокопроизводительного секвенирования, принимая во внимание тот факт, что чем раньше манифестирует болезнь, тем выше вероятность выявления ее генетической основы.

3.1.8. ВЫВОДЫ

В рамках этой научной работы впервые в России проведено столь масштабное исследование таргетных областей генома с целью выявления и описания этиологических причин развития генетически обусловленных болезней, сопровождающихся симптомокомплексом НС среди детского населения. Разработанный алгоритм диагностики этих гетерогенных болезней позволил провести исследование 176 детям с СРНС и обнаружить посредством метода высокопроизводительного секвенирования генетические причины развития клинических проявлений НС у 83 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 8 вариантов с неизвестной патогенностью. Благодаря анализу полученных данных впервые удалось описать частоты различных типов генетически обусловленных болезней, сопровождающихся стойкой протеинурией среди российских детей, 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). Кроме того, нам удалось продемонстрировать, что в пределах одного гена определенные мутации могут быть ассоциированы с определенным возрастом начала 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 нефротическим синдромом, 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 ($p=0,012$).

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 почечной недостаточности.

Наличие нуклеотидных вариантов генома, явившихся причиной развития генетически обусловленного заболевания у обследованных российских детей, коррелирует с ранней манифестацией НС ($p < 0,001$), 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 [150], что позволяет сделать выбор в пользу трансплантации для генетически подтвержденных больных детей, вторично (частично), либо полностью резистентных к проводимой терапии с обязательной генодиагностикой предполагаемых доноров.

Продемонстрированное разнообразие генетической этиологии свидетельствует о том, что обследованные дети болеют различными болезнями, объединенными сходной клинической картиной. 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. Несомненно, что сопоставление наследственных, возрастных, клинических, лабораторных и гистологических данных с результатами генетического тестирования позволит клиницисту сформировать ясное представление о каждом случае НС и оптимизировать процесс принятия клинических решений в вопросах фармакотерапии, частоты и типа клинического мониторинга, а также оценки риска рецидива после трансплантации почки.

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 трех обследованных детей с дебютом болезни до 6 месяцев, отвечающих на терапию

стероидами и не имеющих мутаций ни в одном из исследованных генов. Кроме того, молекулярно-генетическое исследование необходимо рекомендовать проводить детям с семейной историей НС или прогрессирующей болезнью почек.

ГЛАВА 4

КАРДИОМИОПАТИИ

Кардиомиопатии (КМП) – группа болезней миокарда, характеризующихся структурными и функциональными изменениями сердечной мышечной ткани. В педиатрической когорте пациентов КМП являются редкими заболеваниями с ежегодной заболеваемостью от 1,1 до 1,5 случаев на 100 000 человек [590, 732]. Современная классификация кардиомиопатий подразумевает разделение на первичные КМП, развивающиеся вследствие повреждения миокарда, и вторичные КМП, развивающиеся вследствие генерализованных системных заболеваний, сопровождающихся повреждением миокарда. Эти категории разбиты на группы, в соответствии с этиологическими механизмами развития [644].

К первичным КМП относят генетические, приобретенные и смешанные кардиомиопатии. Генетические КМП – это первичные кардиомиопатии, причиной развития которых служат мутации генов, кодирующих различные белки, участвующие в формировании и функционировании миокарда. Их, в свою очередь, подразделяют на гипертрофическую КМП, аритмогенную КМП / дисплазию правого желудочка, некомпактный миокард левого желудочка, PRKAG2- и LAMP2-зависимые болезни накопления гликогена, болезни сердечной проводимости и ионные каналопатии. Смешанные первичные кардиомиопатии подразделяют на дилатационную КМП и рестриктивную КМП, причиной



развития которых могут являться как генетические, так и негенетические, так называемые средовые факторы. Приобретенные первичные КМП подразделяются в соответствии с негенетическими этиологическими факторами на воспалительную КМП (миокардиты); стрессовую КМП («Тако-Цубо»); КМП беременных; КМП, обусловленную тахикардией и КМП детей, рожденных от матерей с СД, тип I [631].

К вторичным кардиомиопатиям относят инфильтративные КМП (амилоидоз, БГ, МПС); КМП накопления (гемохроматоз, БФ, БП, Ниманна–Пика); токсические КМП (лекарственная, химическая, радиационная); эндокринные КМП (диабет, гипертирозидизм, гипотирозидизм, гиперпаратирозидизм, феохромоцитома, акромегалия); воспалительные КМП (саркоидоз); эндомикардиальные КМП (эндомикардиальный фиброз); КМП при нервно-мышечных болезнях; КМП при аутоиммунных болезнях и болезнях соединительной ткани; КМП при синдромах Нунан и Леопард; КМП при дефиците питательных веществ и другие [631]. Позднее ионные каналопатии были выведены из номенклатуры КМП в связи с тем, что мутации генов, отвечающих за ионные каналопатии, могут не приводить к морфофункциональному фенотипу КМП [100].

Хотя взрослые и педиатрические КМП имеют сходные морфологические и клинические проявления, существуют и значительные различия. В течение двух лет с момента манифестации болезни, нормализация функции происходит у 20% детей с ДКМП, тогда как 40% детей умирают или подвергаются трансплантации сердца. 30% детей с ГКМП умирают в течение двух лет с момента манифестации болезни, тогда как смерть у детей старшего возраста встречается редко. Внезапная смерть также встречается редко. Молекулярные данные свидетельствуют о том, что экспрессия генов различается между взрослыми пациентами с КМП и детьми с КМП, предполагая, что ответ на лечение может также отличаться [570].

4.1. ГИПЕРТРОФИЧЕСКАЯ КАРДИОМИОПАТИЯ

Гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) – первичная КМП, характеризующаяся преимущественным утолщением сердечной мышцы левого и/или правого желудочка более 1,5 см, на фоне диастолической дисфункции и хаотичного расположения мышечных волокон, причиной развития которой служат мутации генов, продукты которых вовлечены в формирование и работоспособность миокарда. Большинство пациентов с манифестацией ГКМП во взрослом возрасте обладают нормальной продолжительностью жизни без значительной потери трудоспособности

[632]. У взрослых болезнь встречается с частотой 1 случай на 500 человек, являясь самой частой наследственной болезнью сердечно-сосудистой системы [633]. Однако в педиатрической когорте ежегодная заболеваемость ГКМП встречается гораздо реже, составляя 0,57 случая на 100 000 детей [1019]. У взрослых она может протекать бессимптомно вплоть до внезапной смерти, являясь при этом самой частой причиной внезапной смерти у молодых спортсменов и заставляя высказывать предложения о проведении скрининга на предмет ее выявления [119].

Первые упоминания о преждевременной внезапной смерти обнаружены в афоризмах Гиппократов 2400-летней давности [675]. В XVII и XVIII веках Теофиль Бонет, Джон Батист Морганьи и Уильям Харви по-разному сообщили о своих находках, используя термины: увеличенное сердце с увеличенной мышечной массой, обструкция кровотока из левого желудочка в аорту, гипертрофия, дегенеративные изменения и фиброз миокарда. При этом корреляции были сделаны между анатомическими находками и внезапной смертью с предшествовавшей историей болезни, включающей боль в грудной клетке, сердцебиение и обмороки [254]. В 1869 году два французских патологоанатома Лиувиль и Халлопо впервые описали классический вид асимметричной гипертрофии межжелудочковой перегородки [418, 589]. Первое современное описание ГКМП было опубликовано в 1958 году британским патологоанатомом Дональдом Тиром, подтвердившим документально описанные ранее признаки болезни, выявив инверсию Т-волны и патологические изменения Q-волн на ЭКГ у 8 пациентов в возрасте от 14 до 44 лет, назвав очаговое хаотичное взаимное расположение кардиомиоцитов основным патогномичным гистологическим признаком развития ГКМП и предположив, что фиброз миокарда может являться следствием ишемии [924]. В настоящее время именно ишемия признана ключевой причиной характерной боли в грудной клетке, а также вероятным триггером для аритмии, особенно в совокупности с фиброзом миокарда и наличием кардиомиоцитарной дезорганизации. В 1960 году Brent с соавторами впервые заподозрили менделеевское аутосомно-доминантное наследование ГКМП [179], а в 1962 году Уигл с соавторами предположили, что увеличение мышечной массы сердца связано с диастолической дисфункцией желудочков [1018], что в наше время признано одним из главных функциональных последствий ГКМП. Появление и быстрое развитие эхокардиографии позволило проводить неинвазивную функциональную скрининговую диагностикуотягощенных семей с высокой точностью и низкой себестоимостью [430, 864], а ее широкое внедрение в клиническую кардиологию способствовало оценке необъяснимых гипертрофий левого желудочка в одном случае из 500 [633]. В 1990 году ученым удалось выявить мутацию гена *MYH7*, кодирующего тяжелую цепь бета-миозина, которая явилась



первой подтвержденной на генетическом уровне причиной семейной формы ГКМП в большой франко-канадской семье [370] и ознаменовало открытие эры молекулярной генетики в выявлении этиологических причин развития ГКМП. Загадочная болезнь миокарда перестала считаться идиопатической, ее все чаще стали называть болезнью саркомера [720], наследуемой в большинстве случаев в соответствии с аутосомно-доминантным типом наследования и обладающей варьирующей экспрессивностью и неполной пенетрантностью [563]. К настоящему времени выявлены более 1000 патогенных вариантов 25 генов (табл. 63), кодирующих три функциональных класса белков, причастных к развитию первичной ГКМП: саркомерные белки (миофиламенты), Z-иски и белки, вовлеченные в сигнальный путь регуляции высвобождения ионов кальция [855].

Среди всех описанных мутаций не менее 60% выявляется в генах, кодирующих тяжелую цепь бета-миозина (*MYH7*), миозин-связывающий С-белок (*MYBPC3*), сердечный тропонин Т2 (*TNNT2*), сердечный тропонин I3 (*TNNI3*) и альфа-тропомиозин (*TPM1*), принадлежащие к классу миофиламентов, ответственных за создание молекулярной силы сжатия миоцитов [513]. При этом в гене *TTN*, кодирующем огромный миофиламент, занимающий почти половину саркомера, мутации встречаются довольно редко [101].

Таблица 63. Генетические факторы, приводящие к развитию ГКМП

Ген	Хромосомная локализация	Белок	Частота
Миофиламенты саркомера			
Гигантские миофиламенты			
<i>TTN</i>	2q31	Тинин	Редко
Толстые миофиламенты			
<i>MYH7</i>	14q11.2-q12	Тяжелая цепь бета-миозина	25–40%
<i>MYH6</i>	14q11.2-q12	Тяжелая цепь альфа-миозина	Редко
<i>MYL2</i>	12q23-q24.3	Регуляторная легкая цепь миозина	Редко
<i>MYL3</i>	3p21.2-p21.3	Основная легкая цепь миозина	Редко
<i>MYLK2</i>	20q11.21	Киназа легкой цепи миозина	Редко
Средние миофиламенты			
<i>MYBPC3</i>	11p11.2	Миозин-связывающий С-белок	25–40%
Тонкие миофиламенты			
<i>TNNT2</i>	1q32	Сердечный тропонин Т	3–5%
<i>TNNI3</i>	19p13.4	Сердечный тропонин I	1–5%

Продолжение таблицы 63

Ген	Хромосомная локализация	Белок	Частота
<i>TPM1</i>	15q22.1	α -тропомиозин	1–5%
<i>ACTC</i>	15q14	α -сердечный актин	Редко
<i>TNNC1</i>	3p21.1	Сердечный тропонин С	Редко
Гены, кодирующие цитоскелетные белки / Z-диски			
<i>ACTN2</i>	1q42-q43	α -актинин 2	Редко
<i>ANKRD1</i>	10q23.31	Сердечный анкирин	Редко
<i>CSRP3</i>	11p15.1	Мышечный LIM-белок	Редко
<i>LDB3</i>	10q22.2-q23.3	LIM-связывающий белок 3	Редко
<i>MYOZ2</i>	4q26-q27	Миозенин 2	Редко
<i>TCAP</i>	17q12-q21.1	Телетонин	Редко
<i>VCL</i>	10q22.1-q23	Винкулин	Редко
<i>NEXN</i>	1p31.1	Нексилин	Редко
<i>MYPN</i>	10q21.3	Миопалладин	Редко
Белки, участвующие в регуляции высвобождения ионов кальция			
<i>CALR3</i>	19p13.11	Кальретикулин 3	Редко
<i>CASQ2</i>	1p13.3-p11	Кальзекуестрин 2	Редко
<i>JPH2</i>	20q13.12	Юнктофилин 2	Редко
<i>PLN</i>	6q22.1	Фосфоламбан	Редко
<i>RYR2</i>	1q42.1-q43	Рианодиновый рецептор 2	Редко
Другие белки			
<i>PRKAG2</i>	7q36.1	Субъединица гамма-2 5-АМФ-активирующей протеинкиназы	Редко

В зависимости от анализируемой когорты мутации в генах, кодирующих миофиламенты, выявлялись в среднем у 24–63% среди всех обследованных пациентов. Наименьшее количество пациентов с мутациями было обнаружено в шведской популяции [683], при этом в общеевропейской популяции процент выявленных мутаций превосходил общеамериканские исследования [800]. Для остальных пациентов этиологические причины возникновения ГКМП оставались неизвестными из-за большого числа генов-кандидатов и их значительной протяженности вплоть до разработки высокопроизводительных методов секвенирования нового поколения и рассмотрения других генов-кандидатов, некодирующих белки миофиламенты. В частности, было установлено, что Z-дисковые белки служат молекулярной платформой для передачи сигнала и инициирования нескольких внутриклеточных сигнальных

каскадов [929], что привело к описанию множества мутаций в генах, кодирующих Z-диски [169, 741, 929, 982]. Кроме того, патогенные варианты были обнаружены в генах, отвечающих за регулирование высвобождения ионов кальция [233, 562].

Как показано на рис. 91 [272], саркомерные комплексы миокарда, состоящие из тонких и толстых нитей (миофиламентов), находящихся в постоянном движении друг относительно друга, обеспечивают тем самым чередование процессов мышечного сокращения и расслабления.

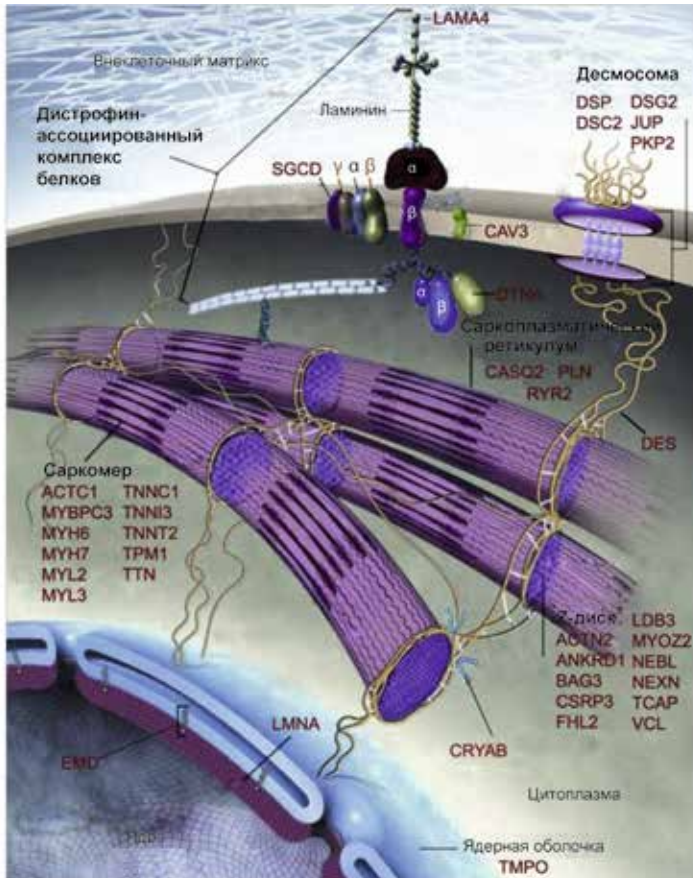


Рис. 91. Схематическое изображение различных белков, мутации которых приводят к развитию КМП. Адаптировано из публикации Dalakas M.C. и соавт., 2000 [272]

Этот механизм обеспечивается за счет энергии, высвобождающейся при гидролизе АТФ, который катализируется миозином, активированным ионами кальция [986]. Благодаря наличию в молекуле миозина двух «шарнирных» устройств так называемые «головки» мио-

зина могут сгибаться, прикрепляясь к актину, и подтягивать актиновые филаменты на 10 нанометров, что становится возможным благодаря тому, что белок актинин, расположенный в области Z-белков, закрепляет концы тонких (актиновых) миофиламентов.

Эти научные открытия прояснили необъяснимые ранее причины гипертрофии миокарда, которые стали рассматривать как своеобразную компенсацию организма в ответ на механическую и биофизическую несостоятельность саркомерного комплекса, сформировав понятие ГКМП как болезни саркомера. Таким образом, в патогенезе ГКМП все чаще стали описывать значимость различных мутаций в генах, кодирующих саркомерные белки, приводящие к нарушению их правильной сборки с появлением характерной для этого заболевания очаговой взаимной дезорганизации кардиомиоцитов (более 5% поперечной площади миокарда) и функциональному снижению сократимости мышечных волокон. Кроме того, неблагоприятное прогностическое значение неправильной взаимной ориентации кардиомиоцитов было высказано и в отношении возникновения первичной электрической нестабильности сердца в связи с возможным нарушением нормального хода волны деполяризации и реполяризации [634].

В большинстве случаев внушительное число описанных генотип-фенотипических корреляций не является достоверным прогностическим маркером для новых случаев болезни [325], так как данных о течении болезни в неродственных семьях с одинаковыми мутациями по-прежнему очень мало в связи со значительной генетической гетерогенностью ГКМП. В частности, первые «злокачественные» мутации *p.R403Q*, *p.R453C*, *p.G716R* и *p.R719W* гена *MYH7* и *p.I79N*, *p.R92Q*, *p.R92W*, *p.160del* и *c.821+1G>A* гена *TNNT2* были описаны у пациентов с высоким риском внезапной смерти и значительно сниженной выживаемостью по сравнению с мягкими вариантами *p.F513C* и *p.V606M* гена *MYH7* с благоприятным прогнозом [899]. При этом в других исследованиях была описана противоречивая патогенность этих же вариантов в других семьях [424]. Кроме того, клиническая картина болезни у разных представителей одной семьи зачастую обладает значительной вариабельностью, что может указывать на существенное влияние других молекулярных механизмов, например, эпигенетических. Так, среди носителей мутации *p.I79N* гена *TNNT2* были члены одной семьи с различными фенотипами КМП: четверо с гипертрофическим, двое с рестриктивным, двое с дилатационным и один со смешанным. При этом, несмотря на высокую частоту сердечных тахикардий у носителей этой мутации, не было описано ни одного случая внезапной смерти [663], что поставило под сомнение ассоциации между отдельными мутациями и выживаемостью пациентов. В допол-

нение к этому противоречивые отчеты стали возникать и о влиянии отдельных мутаций на морфологию гипертрофии. Так, были описаны патогенные варианты *p.R92Q* в гене *TNNT2* и *p.E451Q* в гене *MYBPC3*, ассоциированные с высоким риском внезапной смерти у пациентов, имеющих значительную гипертрофию миокарда [168]. В то же время описаны мутации с высоким риском внезапной смерти в отсутствие значительной гипертрофии левого желудочка [626, 981], что может свидетельствовать о том, что сама по себе гипертрофия левого желудочка не всегда имеет первостепенное значение для установления диагноза ГКМП. Кроме того, Уоткинс с соавторами продемонстрировали явление неполной пенетрантности для мутаций *p.I79N* и *p.R92Q* гена *TNNT2*, носители которых проявили какие-либо клинические признаки ГКМП лишь в 33% и 22% соответственно [1010]. Все эти публикации наглядно иллюстрируют многофакторный характер ГКМП, опровергая мнение о том, что мутация может быть единственным фактором, определяющим клинический фенотип, и доказывают, что необходимо проявлять предельную осторожность при описании прогностического значения конкретных мутаций, даже в рамках одного семейного анализа.

подавляющее большинство ученых сходятся во мнении, что пациенты с выявленными мутациями имеют более тяжелый фенотип по сравнению с пациентами без мутаций: они моложе на момент постановки диагноза, они имеют более выраженную гипертрофию, они отягощены семейным анамнезом [969]. В целях удобства прогнозирования для случаев положительного генетического теста был рассчитан коэффициент риска, равный 4,3 (1,5–12,5%, 95%), который увеличивался в зависимости от возраста, степени обструкции путей оттока и фибрилляции предсердий [736]. Почти для 5% пациентов генетическая диагностика позволяет выявить два и более патогенных варианта в одном или нескольких генах-кандидатах, которые могут модифицировать фенотип, изменяя клиническую картину болезни в сторону ранней манифестации, быстрого прогрессирования и высокого риска аритмий [384, 630].

В Международном руководстве по генетическому тестированию каналопатий и КМП ДНК-диагностика рекомендована всем пациентам с диагнозом ГКМП, а также их родственникам в случае выявления мутации у пробанда [71].

Благодаря технологии секвенирования нового поколения появилась возможность осуществлять ДНК-диагностику ГКМП на основании одно-временного исследования таргетных областей всех известных к настоящему времени генов-кандидатов, что значительно повысило выявляемость мутаций, еще больше расширив представление о клинической гетерогенности болезни [680], а также дало уточненные данные о том, что на долю мутаций в генах, кодирующих Z-диски и белки, участвую-

щие в регуляции высвобождения ионов кальция, приходится не более 1% мутаций, вызывающих ГКМП [597]. Кроме того, разрабатывая алгоритмы диагностики ГКМП методом СНП, необходимо помнить о том, что не менее 5% случаев ГКМП приходится на вторичные КМП, обусловленные другими наследственными болезнями и синдромами [597, 855].

Биохимический и биофизический анализ последствий человеческих мутаций наряду с фундаментальными знаниями о ГКМП и биологии саркомера создает возможность remodelировать человеческое сердце в каждом конкретном случае, обещая предоставить новые стратегии по ограничению или даже предотвращению развития ГКМП в ближайшем будущем, поэтому выявление генетических причин развития ГКМП в каждом конкретном случае имеет особую ценность.

4.2. ДИЛАТАЦИОННАЯ КАРДИОМИОПАТИЯ

Дилатационная кардиомиопатия (ДКМП) – прогрессирующее заболевание сердечной мышцы, характеризующееся увеличением желудочковой камеры и сократительной дисфункцией. Доля ДКМП составляет 30–40% от всех случаев сердечной недостаточности и является наиболее частой причиной трансплантации сердца [414]. В педиатрическом возрасте ДКМП встречается редко и характеризуется ежегодной частотой 0,57 случая на 100 000 детей [1019]. Единственной официальной оценкой распространенности идиопатической ДКМП среди взрослых является исследование, проведенное в штате Миннесота с 1975 по 1984 годы, в результате которого частота болезни была оценена как 1 : 2700 [255]. Несмотря на отсутствие официальных эпидемиологических популяционных исследований последних лет, предыдущая оценка пересмотрена и считается равной 1 : 250 [435]. Многочисленные семейные генетические исследования обеспечили информационную составляющую о патогенных вариантах 50 генов (табл. 64) [414, 772], однако достоверную частоту встречаемости генетических форм несиндромальной первичной ДКМП оценить не представляется возможным, так как генетические мутации выявляются лишь в 40–50% семей, составляя при этом 30–50% всех случаев ДКМП [437]. Помимо значительно преобладающего аутосомно-доминантного типа наследования, встречаются также аутосомно-рецессивный и X-сцепленный типы наследования патогенных вариантов. Кроме того, для ДКМП, как и для других аутосомно-доминантных болезней, было обнаружено довольно внушительное число спорадических случаев возникновения болезни [438].

Таблица 64. Генетические факторы, приводящие к развитию ДКМП

Ген, OMIM	Хромосомная локализация	Белок	Частота
Гены, кодирующие белки саркомера			
<i>TTN</i> , 188840	2q31	Тинин	10–15%
<i>MYH7</i> , 160760	14q11.2-q12	Тяжелая цепь бета-миозина	1–5%
<i>MYH6</i> , 160710	14q11.2-q12	Тяжелая цепь альфа-миозина	1–5%
<i>MYBPC3</i> , 600958	11p11.2	Миозин-связывающий С-белок	1–5%
<i>TNNT2</i> , 191045	1q32	Сердечный тропонин Т	1–5%
<i>TNNI3</i> , 191044	19p13.4	Сердечный тропонин I	Редко
<i>TPM1</i> , 191010	15q22.1	α-тропомиозин	Редко
<i>ACTC1</i> , 102540	15q14	α-сердечный актин	Редко
<i>TNNC1</i> , 191040	3p21.1	Сердечный тропонин С	1–5%
<i>MYLK2</i> , 606566	20q11.21	Киназа легкой цепи миозина	1–5%
<i>Гены, кодирующие цитоскелетные белки / Z-диски</i>			
<i>ACTN2</i> , 102573	1q42-q43	α-актинин 2	Редко
<i>ANKRD1</i> , 609599	10q23.31	Сердечный анкирин	1–5%
<i>BAG3</i> , 603883	10q26.11	BCL2-ассоциированный атаноген 3	1–5%
<i>CSRP3</i> , 600824	11p15.1	Мышечный LIM-белок	Редко
<i>LDB3</i> , 605906	10q22.2-q23.3	LIM-связывающий белок 3	1–5%
<i>TCAP</i> , 604488	17q12-q21.1	Телетонин	Редко
<i>VCL</i> , 193065	10q22.1-q23	Винкулин	1–5%
<i>NEXN</i> , 613121	1p31.1	Нексилин	1–5%
<i>MYPN</i> , 608517	10q21.3	Миопалладин	1–5%
<i>CRYAB</i> , 123590	11q23.1	Альфа-кристаллин В	Редко
<i>LAMA4</i> , 600133	6q21	Альфа-ламинин 4	1–5%
<i>SGCD</i> , 601411	5q33.3	Дельта-саркогликан	Редко
<i>DES</i> , 125660	2q35	Десмин	Редко
<i>DMD</i> , 300377	Xp21.2-p21.1	Дистрофин	Редко
<i>FKTN</i> , 607440	9q31.2	Фукутин	Редко
<i>FKRP</i> , 606596	19q13.32	Фукутин-родственный белок	Редко
<i>ILK</i> , 602366	11p15.4	Интегрин-связывающая киназа	Редко

Продолжение таблицы 64

Ген, OMIM	Хромосомная локализация	Белок	Частота
Гены, кодирующие белки, участвующие в сборке ядерной оболочки			
<i>LMNA</i> , 150330	1q22	Ламин А/С	1–5%
<i>EMD</i> , 300384	Xq28	Эмерин	Редко
<i>TMPO</i> , 188380	12q23.1	Тимопоэтин	Редко
<i>Гены, кодирующие белки интеркалированного диска (десмосомы)</i>			
<i>DSC2</i> , 125645	18q12.1	Десмоколлин 2	1–5%
<i>DSG2</i> , 125671	18q12.1	Десмоглеин 2	1–5%
<i>DSP</i> , 125647	6p24.3	Десмоплакин	5–10%
<i>JUP</i> , 173325	17q21.2	Плакоглобин	Редко
<i>PKP2</i> , 602861	12p11.21	Плакофилин 2	1–5%
<i>Гены, кодирующие белки, участвующие в регуляции высвобождения ионов кальция/натрия</i>			
<i>PLN</i> , 172405	6q22.1	Фосфоламбан	Редко
<i>RYR2</i> , 180902	1q42.1-q43	Рианодиновый рецептор 2	Редко
<i>ABCC9</i> , 601439	12p12.1	АТФ-связывающий кассетный транспортер, подсемейство С9	Редко
<i>SCN5A</i> , 600163	3p22.2	Альфа-субъединица натриевого канала, тип 5	1–5%
<i>Гены, кодирующие факторы транскрипции</i>			
<i>TBX20</i> , 606061	7p14.2	Т-бокс 20	Редко
<i>Другие гены</i>			
<i>EYA4</i> , 603550	6q23.2	Гомолог отсутствия глаз 4	Редко
<i>GATAD1</i> , 614518	7q21.2	GATA-белок 1 с доменом цинковых пальцев	Редко
<i>PSEN1</i> , 104311	14q24.2	Презенелин 1	Редко
<i>PSEN2</i> , 600759	1q42.13	Презенелин 2	Редко
<i>RBM20</i> , 613171	10q25.2	РНК-связывающий белок 20	5–10%
<i>SDHA</i> , 600857	5p15.33	Субъединица А сукцинатдегидрогеназного комплекса	Редко
<i>TAZ</i> , 300394	Xq28	Тафацин	Редко
<i>CAV3</i> , 601253	3p25.3	Кавеолин	Редко
<i>LAMP2</i> , 309060	Xq24	Мембранный белок 2, ассоциированный с лизосомой	Редко
<i>TXNRD2</i> , 606448	22q11.21	Тиоредоксин-редуктаза 2	Редко

Примечание. Выделение жирным шрифтом использовано для генов, чье описание в базе данных OMIM не связано с ДКМП.

Редкие патогенные варианты генов, включенных в табл. 64, могут быть вовлечены в развитие различных КМП, мышечных дистрофий и синдромальных болезней, нарушая функциональную активность белков, участвующих в работе миокарда, и приводя в конечном счете к фенотипу ДКМП [435]. Многоцентровые исследования последних лет доказали, что при сравнении частот встречаемости мутантных генов в различных популяционных группах обнаруживается удивительно мало различий [414]. От 10 до 20% семейных и спорадических случаев ДКМП вызывается патогенными вариантами гена *TTN*, приводящими к преждевременной терминации трансляции, считаясь наиболее частыми из выявленных к настоящему времени генетических причин развития ДКМП [431]. ДКМП обладает высокой аллельной гетерогенностью; одинаковые мутации крайне редко встречаются в различных семьях. Некоторые ученые считают, что низкий процент выявляемости семейных случаев ДКМП может быть связан с протяженными делециями и дупликациями генов-кандидатов [412, 729], однако целенаправленными исследованиями это предположение не подтверждается [728]. В независимости от факта выявления мутаций эхокардиографические и электрокардиографические исследования доказали 20–30%-ную заболеваемость родственников первой степени в семьях с подтвержденным ранее диагнозом [111]. Рекомендации по диагностике ДКМП, изложенные в 2009 году в труде Хершбергера, включают изучение семейной истории, сердечно-сосудистую функциональную диагностику родственников первой степени и молекулярно-генетическое тестирование [436]. Поскольку человек с ДКМП может оставаться бессимптомным в течение многих лет, а функциональная диагностика может не выявлять начавшегося незначительного повреждения сердца, молекулярно-генетическая диагностика имеет очевидную актуальность, особенно в случае выявления у бессимптомного родственника пробанда патогенного варианта генома. Такие находки позволяют объяснить возрастную пенетрантность и вносят регулярность в проведение функциональной диагностики для носителей патогенных вариантов. Благодаря семейному подходу к изучению генетических причин возникновения ДКМП были найдены семьи, в которых как отцовские, так и материнские мутации вносят вклад в патологический вариант генома пробанда, при этом мутации могут встречаться как в одном, так и двух разных генах [576, 592]. Кроме того, было описано множество случаев перипартальной кардиомиопатии как начальной стадии семейной ДКМП, что может свидетельствовать о генетической составляющей в патофизиологии сердечной недостаточности в период беременности [974].

Большинство генетических исследований проводится на семейном материале, однако считается, что частота спорадических случаев

сравнима с семейными [438]. Поэтому в нашем исследовании была предпринята попытка выявить генетические причины развития ДКМП как у детей с семейным анамнезом, так и у детей без семейного анамнеза. В настоящее время для диагностики ДКМП одиночные гены используют крайне редко, стараясь объединять их в мультигенные панели и изучать комплексно при помощи технологии высокопроизводительного секвенирования на больших когортах пробандов, отобранных по фенотипу. При этом панель должна охватывать как можно больше таргетных областей генов, для которых доказана связь с развитием ДКМП, включая синдромальные формы ДКМП, которые, как правило, встречаются довольно редко. Подобные исследования способны произвести переоценку сложности фенотипической архитектуры ДКМП, что было показано в работах по изучению фосфорилирования мутированного титина, изменяющегося под действием окислительного стресса у женщин с перипартальной кардиомиопатией [972]. Убедительные данные существуют для фенотипического проявления мутаций гена *LMNA*, носители которых демонстрируют плохие прогнозы из-за возникновения желудочковых аритмий и внезапной сердечной смерти [973]. Аналогичным образом было показано, что обладатели мутаций гена *RBM20* имеют быстрое прогрессирование сердечной недостаточности и высокий риск возникновения аритмии [795].

В том случае, когда генетические исследования выявляют отсутствие семейной сегрегации мутации с клиническим фенотипом, следует учитывать другие механизмы развития ДКМП, такие как эпигенетические (микроРНК, гистоновые модификации и метилирование ДНК) [345, 415, 992].

4.3. РЕСТРИКТИВНАЯ КАРДИОМИОПАТИЯ

Рестриктивная кардиомиопатия (РКМП) – заболевание, вызванное уплотнением эндокарда, нарушением мышечной релаксации, нарушением диастолической функции желудочков без гипертрофии и дилатации с нормальной систолической функцией в большинстве случаев. У детей РКМП встречается очень редко, приблизительно в 3–4 случаях на 10 000 000 детей, составляя менее 5% всех случаев КМП в педиатрическом возрасте [590], и в 30% РКМП встречается у детей в смешанной с ГКМП формой [1011]. У взрослых РКМП встречается реже остальных КМП. Ее истинная частота до сих пор неизвестна. В США и Европе на



РКМП приходится не более 5% всех случаев КМП, включая ненаследственные. Наиболее распространенными симптомами РКМП являются снижение толерантности к физической нагрузке, одышка, периферические отеки и сильное сердцебиение [134]. Семейные рестриктивные кардиомиопатии обычно наследуются в соответствии с аутосомно-доминантным типом и выявляются редко [337], чаще всего встречаясь в определенных популяционных группах Азии, Южной и Центральной Америки [551]. Литературные данные указывают на 5%-ную частоту случаев РКМП, возникающих вследствие возникновения мутаций 4 генов: *ACTC1*, *MYH7*, *TNNI3*, *TNNT2* (табл. 65) [858]. В других публикациях описана 35%-ная частота выявления клинически значимых генетических причин развития РКМП с преобладанием мутаций в генах *TNNI3* (18%) и *MYH7* (14%) [926]. Мутации в генах *DES* и *BAG3* вызывают развитие РКМП крайне редко [754]. Были описаны случаи сочетания фенотипа РКМП с фенотипом ГКМП у одних и тех же больных детей [505].

Таблица 65. Генетические факторы, приводящие к развитию РКМП

Ген, OMIM	Хромосомная локализация	Белок	Частота
Гены, кодирующие белки саркомера			
<i>MYH7</i> , 160760	14q11.2-q12	Тяжелая цепь бета-миозина	10–15%
<i>TNNT2</i> , 191045	1q32	Сердечный тропонинТ	1–5%
<i>TNNI3</i> , 191044	19p13.4	Сердечный тропонинI	15–20%
<i>ACTC1</i> , 102540	15q14	α-сердечный актин	1–5%
Гены, кодирующие Z-диски и цитоскелетные белки			
<i>DES</i> , 125660	2q35	Десмин	Редко
<i>BAG3</i> , 603883	10q26.11	BCL2-ассоциированный атаноген 3	Редко

Примечание. Частоты встречаемости мутаций генов, указанных в таблице, приведены на основании данных обзорной работы П. Тиикакирикула с соавторами [926].

Генетически опосредованные состояния, которые, как известно, вызывают вторичную РКМП, включают гемохроматоз, ГБ, БФ, БГ, МПС, тип I, а также синдромальные состояния, такие как синдром Нунан [19, 921].



4.4. АРИТМОГЕННАЯ КАРДИОМИОПАТИЯ

Аритмогенная кардиомиопатия (АКМП) характеризуется деградацией миоцитов и фиброзной инфильтрацией миокарда, ассоциируясь с повышенной восприимчивостью к аритмии и внезапной смерти, особенно у спортсменов и молодых людей [262]. В последнее время признается вовлеченность левого желудочка в клиническую картину болезни [859]. Распространенность АКМП приравнивается к одному случаю на 2000–5000 живых новорожденных, при этом от 30% до 50% описанных случаев являются семейными [261]. Наиболее частым типом наследования АКМП является аутосомно-доминантный тип с неполной пенетрантностью и вариабельной экспрессивностью, с преобладающим развитием у молодых мужчин в возрасте до 40 лет по сравнению с женщинами [123]. Начиная с 1994 года, международная группа ученых установила критерии клинического диагноза АКМП на основе электрокардиографических данных (реполяризация, депполяризация или аномалии проводимости), наличие аритмий, структурных и гистопатологических дефектов, а также семейного анамнеза. Эти критерии, пересмотренные в 2010 году, делятся на шесть категорий с основными и второстепенными функциями. Пациенты в том случае соответствуют критериям АКМП, когда выполняются два основных, один основной и один второстепенный, либо 4 второстепенных критерия [625].

Зачастую АКМП описывается как болезнь десмосомы, представляющей мультибелковый комплекс, который образует межклеточные взаимодействия, связывая промежуточные филаменты соседних ячеек, создавая тем самым функциональную межклеточную сеть. Десмосомы особенно распространены в тканях, подверженных механическим нагрузкам, таким как сердечная мышца и кожа, что объясняет фенотипический спектр сердечных и кожных проявлений АКМП. Большинство патогенных вариантов генома, ответственных за развитие рассматриваемой патологии, приходится на пять генов, кодирующих десмосомные белки: десмоплакин (*DSP*), десмоколлин-2 (*DSC2*), десмоглин-2 (*DSG2*), плакоглобин (*JUP*) и плакофилин-2 (*PKP2*) (табл. 66) [290].

Рецессивные формы наследования были описаны у пациентов с перекрывающимся фенотипом ДКМП и АКМП и мутациями генов *DSP* и *JUP*, кучерявыми волосами и пальмоплантарным гиперкератозом. Было описано несколько недесмосомальных генов, вызывающих АКМП, например, ген, кодирующий трансмембранный белок TMEM43.

Таблица 66. Генетические факторы, приводящие к развитию АКМП

Ген, OMIM	Хромосомная локализация	Белок	Частота
<i>Гены, кодирующие белки интеркалированного диска (десмосомы)</i>			
<i>DSC2, 125645</i>	18q12.1	Десмоколлин 2	1–5%
<i>DSG2, 125671</i>	18q12.1	Десмоглеин 2	12–40%
<i>DSP, 125647</i>	6p24.3	Десмоплакин	6–16%
<i>JUP, 173325</i>	17q21.2	Плакоглобин	Редко
<i>PKP2, 602861</i>	12p11.21	Плакофилин 2	11–43%
<i>Гены, кодирующие белки, участвующие в регуляции высвобождения ионов кальция/натрия</i>			
<i>RYR2, 180902</i>	1q42.1-q43	Рианодиновый рецептор 2	Редко
<i>Гены, кодирующие белки саркомера</i>			
<i>TTN, 188840</i>	2q31	Тинин	Редко
<i>Другие гены</i>			
<i>TMEM43, 606448</i>	3p25	Трансмембранный белок 43	Редко
<i>TGFB3, 190230</i>	14q24.3	Трансформирующий фактор роста В3	Редко
<i>CTNNA3</i>	10q21.3	Катенин альфа 3	Редко

Примечание. Выделение жирным шрифтом использовано для генов, чье описание в базе данных OMIM не связано с АКМП. Частоты случаев АКМП, вызванных патогенными вариантами генов, указанных в таблице, приведены на основании данных обзорной работы П. Тиикакирикула с соавторами [926].

Несмотря на то, что доказательства, связывающие этот ген с АКМП, являются достоверными, были описаны единичные патогенные варианты [122, 672]. В недавнем исследовании, демонстрирующем некоторые свидетельства того, что варианты гена *TTN* могут играть роль в этиологии АКМП, несколько миссенс-вариантов были идентифицированы и один сегрегирован с болезнью у многих пораженных лиц [187]. Другими генами, мутации которых приводят к развитию АКМП, были признаны гены *TGFB3* и *RYR2*, ассоциированные также с синдромом Лойса–Дитца и катехоламинергической полиморфной желудочковой тахикардией соответственно [816, 918].

Анализ кодирующей последовательности всех десмосомных генов позволяет выявить мутации у 50% людей с АКМП, причем до 40%

случаев патогенных вариантов приходится на ген *DSG2* [290, 965]. Большинство кардиологических обществ Европы и Америки рекомендуют генетическое тестирование для членов семьи пробанда, но оценивают возможности скрининга пациентов с использованием панели генов *DSC2*, *DSG2*, *DSP*, *JUP* и *TMEM43* ниже, чем скрининга пациентов с использованием соответствующей панели генов в случае ГКМП [71]. Известно, что доля пациентов с более чем одним патогенным вариантом выше при болезнях с низкой пенетрантностью, особенно это характерно для АКМП [1039]. Кроме того, пациенты с мутациями генов, кодирующих десмосомные компоненты, зачастую обладают вариабельной экспрессивностью, связанной с возрастом, поэтому ранняя идентификация мутаций имеет для таких пациентов неизвестное прогностическое значение [783].

4.5. НЕКОМПАКТНАЯ КАРДИОМИОПАТИЯ

Некомпактная кардиомиопатия (НКМП) – болезнь миокарда, обуславливающая губчатое или трабекулярное строение эндомиокардиального слоя сердечной мышцы, вместо гладкого и плотного. Частота встречаемости НКМП составляет 0,12 случая на 100 000 детей в возрасте до 10 лет и 0,81 случая на 100 000 детей в возрасте до 1 года [1011]. При этом на НКМП приходится лишь 4,8% всех случаев детской КМП [170]. В 23% случаев НКМП встречается изолированно, в 59% случаев НКМП встречается в смешанной форме с ДКМП, в 11% случаев – в смешанной форме с ГКМП [495]. Кроме того, есть сведения о том, что от 12% до 18% случаев НКМП приходится на долю пациентов со спорадической формой НКМП, диагностированных в раннем возрасте [1043]. Дусек впервые описал патологическую постнатальную персистенцию губчатого миокарда в 1975 году [299], а Энгбердинг и Бендер сделали первое клиническое описание этого состояния с помощью двухмерной эхокардиографии в 1984 году [320].

Желудочковые миокардиальные трабекуляции, называемые синусоидами, проявляются в сердце человека к концу первого триместра беременности, позволяя увеличить отношение площади поверхности к объему, необходимому для диффузии кислорода, и увеличивая тем самым мышечную массу до создания коронарных артерий. После окончания развития коронарной сосудистой сети синусоиды исчезают и происходит уплотнение трабекулярных слоев, трансформируя губчатый миокард в компактную мускулатуру. К четвертому месяцу беременно-



сти уплотненный миокард составляет большую часть объема желудочков [427]. Уплотнение продолжается в постнатальный период с продолжающимся ростом и повышением системного давления. У пациентов с НКМП уплотнение трабекулярных слоев не происходит должным образом, что приводит к развитию утолщенного и неуплотненного эндомиокардиального слоя с миокардиальной трабекулярностью и дальнейшей дисфункции миокарда [757]. Важно отметить, что эти изменения происходят при отсутствии сопутствующего врожденного поражения [804]. При этом одни люди с НКМП могут не иметь никаких симптомов болезни всю свою жизнь, тогда как другие страдают одышкой и болями в груди, у них проявляется нарушение сердечного ритма, головокружение и обмороки. Именно миокардиальная трабекулярность определяет склонность к тромбоэмболии (21–24%), которая может вызвать сердечную недостаточность и инсульт, а также характерные предсердные (5–29%) и желудочковые (18–47%) аритмии, которые могут привести к внезапной сердечной смерти [510, 905]. Кроме того, миокардиальная трабекулярность со временем может привести к прогрессирующей дилатации желудочка, что отчасти объясняет перекрывание фенотипов НКМП и ДКМП у одних и тех же пациентов [60].

Всемирная организация здравоохранения и Европейское общество кардиологов относят НКМП к неклассифицируемой КМП [310, 802], с другой стороны, Американская кардиологическая ассоциация классифицирует НКМП как первичную КМП [631].

Ранее НКМП диагностировалась довольно редко; недавно появившиеся новые методы визуализации с более высоким разрешением позволили обнаруживать трабекуляцию сердца гораздо чаще, что значительно увеличило процент больных НКМП за счет пациентов, обладающих мягким фенотипом болезни, не выявляемым ранее. На эхокардиограмме НКМП характеризуется как двухслойная структура миокарда с тонким и уплотненным эпикардиальным слоем и вдвое более толстым, неуплотненным эндомиокардиальным слоем с глубокими миокардиальными трабекулами [496]. МРТ обеспечивает более высокое пространственное разрешение посредством получения изображений во всех плоскостях. Для МРТ, в отличие от ЭКГ, отношение некомпактного слоя к компактному чуть выше ($>2,3$), а измерения проводятся в конце диастолы [88]. При этом необходимо отметить, что отсутствие автоматических систем подсчета для измерения этих слоев на ЭКГ и МРТ может приводить к ошибочной интерпретации результатов, поэтому автоматизированная сегментация трабекул миокарда может быть перспективным направлением для диагностики НКМП [494].

Многочисленные молекулярно-генетические исследования показали, что во многих случаях, когда наблюдается эндомиокардиальная

гипертрабекуляция, выявляются мутации тех же генов, которые описаны при ГКМП и ДКМП, что также предполагает значительную долю перекрытия этих состояний. Кроме того, существует гипотеза приобретенного патогенеза НКМП у пациентов с предшествующей нормальной сердечной структурой и функцией, что подтверждает гипотезу о том, что НКМП может представлять собой морфологический континуум генетически обусловленных КМП, включая ГКМП и ДКМП [735]. В обзорной работе Бхатия с соавторами оценивают частоту возникновения НКМП у членов семей, диагностированных на основании обследования пробанда, в 30% [147]. Тогда как спорадическая форма НКМП составляет до 60–70% случаев [71]. Кроме того, установлено, что НКМП зачастую сочетается с синдромом Барта и другими митохондриальными КМП и миотонической дистрофией [335]; мутации генов *MYH7* и *ACTC1* чаще встречаются в семейных случаях НКМП, тогда как мутации генов *MYH7* и *TNNT2* ассоциированы со спорадической формой возникновения НКМП (табл. 67) [288, 531].

Таблица 67. Генетические факторы, приводящие к развитию НКМП

Ген, OMIM	Хромосомная локализация	Белок	Частота
Гены, кодирующие белки саркомера			
<i>MYH7</i> , 160760	14q11.2-q12	Тяжелая цепь бета-миозина	10–15%
<i>MYBPC3</i> , 600958	11p11.2	Миозин-связывающий С-белок	1–5%
<i>ACTC1</i> , 102540	15q14	α-сердечный актин	Редко
<i>TNNT2</i> , 191045	1q32	Сердечный тропонин Т	1–5%
Гены, кодирующие Z-диски и цитоскелетные белки			
<i>LDB3</i> , 605906	10q22.2-q23.3	LIM-связывающий белок 3	1–5%
<i>VCL</i> , 193065	10q22.1-q23	Винкулин	1–5%
Гены, кодирующие белки, участвующие в сборке ядерной оболочки			
<i>LMNA</i> , 150330	1q22	Ламин А/С	Редко
Другие гены			
<i>DTNA</i> , 601239	18q12.1	Дистробревин	Редко
<i>TAZ</i> , 300394	Xq28	Тафацин	1–5%

Примечание. Частоты случаев НКМП, вызванных патогенными вариантами генов, указанных в таблице, приведены на основании данных обзорной работы П. Тиикакирикула с соавторами [926].

Вариабельная экспрессивность этих генов может дать представление о различиях в степени тяжести заболевания, а также найти общую связь НКМП с другими КМП. Большинство специалистов сходятся во мнении, что процент выявляемости этиологических генетических причин развития НКМП, составляющий приблизительно 25%, – слишком низкий, поэтому для обнаружения причинных мутаций в каждом конкретном случае необходимо исследовать более протяженные таргетные области генома человека, вплоть до полноэкзомного исследования.

Текущие рекомендации по лечению НКМП соответствуют международным рекомендациям по предупреждению и лечению сердечной недостаточности. Лечение обычно требует сочетания бета-блокаторов, ингибиторов АПФ, диуретиков и антагонистов альдостерона [578]. Показано, что пожизненная системная антикоагуляция позволяет избежать риска тромбоэмболии. Имплантированные автоматические дефибрилляторы рекомендуются пациентам с $EF < 35\%$ или с выявленными опасными для жизни аритмиями [811]. Кроме того, у 12% пациентов с НКМП развивается тяжелая сердечная недостаточность, что требует трансплантации сердца [324].

Разнообразие фенотипических проявлений кардиомиопатий является следствием генетических, эпигенетических и внешнесредовых факторов, внося свой вклад в фенотип каждого пациента (рис. 92).



Рис. 92. Влияние различных факторов на фенотип людей, болеющих генетически обусловленными формами КМП

Наследственные кардиомиопатии, как и большинство других наследственных болезней с аутосомно-доминантным типом наследования, проявляют значительную фенотипическую вариабельность даже в пределах одной семьи, а пенетрантность их генетических признаков зачастую находится в зависимости от возрастных характеристик. У большинства пациентов с ГКМП гипертрофия манифестирует в подростковом возрасте, тогда как наследственная форма ДКМП считается бимодальной и манифестирует как в детстве, так и во взрослой жизни [560]. Ранние исследования в основном характеризуются описанием тяжелых случаев КМП, возникших спорадически, тогда как более поздние исследования демонстрируют высокий процент семейных случаев болезни преимущественно с мягким, иногда нетипичным течением, невыявляемых ранее [1009]. Также становится очевидно, НКМП далеко не всегда ассоциируется с очень высокими показателями кардиоэмболизма и сердечной недостаточности [596, 625]. Все эти достижения последних лет стали возможными благодаря развитию высокотехнологичных методов диагностики, в первую очередь молекулярно-генетической диагностики методом высокопроизводительного секвенирования. В отличие от селективного скрининга, проводимого негенетическими методами и доказавшего свою неэффективность, особенно для родственников первой степени, молекулярная диагностика позволяет выявить наследственные причины возникновения и развития КМП и проследить их наследование в семьях [1032]. Для реализации этих целей ведущие лаборатории мира исследуют таргетные области генома, включающие гены, для которых ранее была доказана связь с фенотипическими проявлениями КМП. Благодаря корректной биоинформатической обработке данных, полученных в ходе исследований, удастся обнаружить истинную причину развития патологии, зачастую исключая патогенность вариантов, описанных ранее, ввиду их значительной популяционной распространенности. При этом знание патогенных генетических вариантов позволяет не только очертить круг потенциально затронутых родственников для проведения дальнейшего медико-генетического консультирования в зависимости от типа наследования мутаций, но и скорректировать надлежащую терапию пациента. Одним из множества примеров может являться восприимчивость к развитию болезни проводимости у пациентов с ДКМП, возникающей вследствие мутаций гена *LMNA*, что является достаточным фактором для введения кардиостимулятора и рассмотрения вопроса о применении имплантируемого кардиовертер-дефибриллятора [751].

Неполная пенетрантность, которая осложняет медико-генетическое консультирование семей с КМП, порождает надежды на разработку новых методов лечения, модифицирующих болезнь. Основные



мутации вызывают тонкие клеточные пертурбации, которые переносятся их носителями в течение определенного временного периода жизни, а во многих случаях и на протяжении всей жизни, что свидетельствует о существовании компенсаторных механизмов. Манифестация очевидных клинических признаков болезни может быть довольно стремительной как при гипертрофических, так и при дилатационных КМП [976], что указывает на переломный момент, вызывающий декомпенсацию. Новым методам лечения может потребоваться лишь тонкое смещение клеточных переменных для поддержания компенсированного состояния, особенно если терапия начинается с бессимптомных носителей мутаций, выявленных путем каскадного скрининга в отягощенных семьях.

В наши задачи входило изучение молекулярно-генетических особенностей развития генетически обусловленных КМП среди детей из популяций, населяющих территорию современной России, изучение генотип-фенотипических корреляций новых вариантов генома и изучение наследования выявленных вариантов в отягощенных семьях, закладывая основу создания Всероссийского регистра больных КМП с обязательным внесением в него выявленных этиологических вариантов с обуславливаемым ими клиническим фенотипом.

4.6. ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ОСНОВ КАРДИОМИОПАТИЙ У РОССИЙСКИХ ДЕТЕЙ

В 2016 году нами был разработан метод диагностики генетически обусловленных КМП при помощи технологии высокопроизводительного секвенирования. Очевидно, что эти преимущественно аутосомно-доминантные болезни имеют немалую распространенность, значительную генетическую гетерогенность и неоспоримую медицинскую значимость, поэтому некоторые гены, мутации которых вызывают КМП, занимают видное место в списке генов Американской коллегии медицинской генетики и геномики и должны подвергаться обязательному анализу во всех случаях секвенирования экзона и генома [401].

4.6.1. СЕЛЕКТИВНЫЙ СКРИНИНГ КАРДИОМИОПАТИЙ

В исследование были включены кодирующие и прилегающие интронные области 75 генов, мутации которых вовлечены в развитие

синдромальных состояний, нервно-мышечных заболеваний, 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, FHL1, 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 метод позволил исследовать таргетные области этих генов у 199 детей с подозрением на генетически обусловленные КМП и выявить 173 варианта у 179 (90,0%) детей из 176 семей в возрасте от 4 месяцев до 17 лет и 11 месяцев на момент проведения обследования с распределением по полу: 105 (58,3%) мальчиков и 75 (41,7%) девочек. Кроме того, протяженная делеция хромосомной области 1p36 была выявлена у двух детей: один из которых страдал НКМП, тогда как у другого был диагностирован смешанный фенотип ДКМП и НКМП, с помощью технологии ХММА. У остальных 18 детей были выявлены вероятно доброкачественные и доброкачественные нуклеотидные варианты, частоты встречаемости которых в контрольной выборке пациентов из базы данных gnomAD [376] превышают 0,01%, что, в соответствии с российским Руководством по интерпретации данных последовательности нуклеотидов ДНК, не позволяет считать их этиологическими факторами развития КМП с доминантным наследованием [51]. Вероятно, что мутации могут находиться и в других генах, не включенных в панель, либо КМП этих пациентов может быть вызвана ненаследственными факторами.

4.6.2. КЛИНИЧЕСКИЕ, ГЕОГРАФИЧЕСКИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КАРДИОМИОПАТИЙ

Средний возраст детей с выявленными мутациями на момент проведения исследования составил 7 лет и 8 месяцев, медиана – 7 лет и 5 месяцев. Средний возраст манифестации болезни составил 2 года и 11 месяцев, медиана – 5 месяцев. При этом с рождения болеют 37 (20,4%) обследованных детей с генетически обусловленными КМП.

У 72 (39,8%) детей не удалось оценить характер наследования ввиду отсутствия биологического материала от одного из родителей



либо от обоих родителей. Среди оставшихся 109 пациентов КМП 74 (67,9%) детей носила семейный характер: 29 (39,2%) детей унаследовали КМП от отца, 35 (47,3%) детей – от матери, а еще 10 (13,5%) детей развили КМП с рецессивной моделью, унаследовав патогенные варианты от отца и матери, у 35 (32,1%) пациентов КМП носила спорадический характер, который подтверждался отсутствием клинических проявлений болезни и патогенных вариантов у родителей. Выявленные пропорции семейных и спорадических случаев КМП коррелируют с данными зарубежных исследований [670].

Географические особенности детей с генетически обусловленными КМП были установлены для 179 (98,9%) пациентов из 176 семей (табл. 68).

Все выявленные случаи детей с генетически обусловленными КМП, для которых были установлены места их проживания, распределились по 54 (62,8%) субъектам РФ с преобладанием в Москве (43/24,0%), Московской области (11/6,1%) и Краснодарском крае (9/5,0%). Значительный процент выявляемых случаев в этих трех субъектах РФ может указывать на высокую численность населения, либо на преимущественную госпитализацию детей в наш Центр именно из этих регионов РФ. В связи с тем, что КМП у детей относятся к редким болезням [570], частоты их встречаемости в различных субъектах РФ представляют не меньший интерес, чем для других заболеваний, включенных в данную научную работу. При этом важность определения места проживания и национальностей детей с определенными, в том числе с новыми мутациями, также актуально, так как позволяет связать найденные варианты генома с географическим регионом, либо с популяционной принадлежностью.

Таблица 68. Распределение обследованных пациентов с генетически обусловленной КМП в различных субъектах РФ

Субъект	Численность населения	Число семей	Число случаев	Частота в субъекте*
Москва	12 615 882	43	43	1:293 393
Московская область	7 599 756	11	11	1:690 887
Краснодарский край	5 648 254	9	9	1:627 584
Республика Башкирия	4 051 005	5	5	1:810 201
Волгоградская область	2 507 488	5	5	1:501 497
Калужская область	1 009 377	5	5	1:201 875

Продолжение таблицы 68

Субъект	Численность населения	Число семей	Число случаев	Частота в субъекте*
Ставропольский край	2 795 103	5	5	1:559 021
Иркутская область	2 397 832	3	4	1:599 458
Нижегородская область	3 214 657	4	4	1: 803 664
Орловская область	739 465	3	4	1:184 866
Самарская область	3 183 038	4	4	1:795 760
Челябинская область	3 475 727	3	4	1:868 932
Алтайский край	2 332 511	3	3	1:777 504
Брянская область	1 200 228	3	3	1:400 076
Республика Дагестан	3 085 738	3	3	1:1 028 579
Курская область	1 107 041	3	3	1:369 014
Оренбургская область	1 963 007	3	3	1:654 336
Саратовская область	2 440 729	3	3	1:813 576
Смоленская область	942 363	3	3	1:314 121
Ульяновская область	1 238 424	3	3	1:412 808
Ханты-Мансийский АО	1 663 798	3	3	1:554 599
Республика Адыгея	454 762	2	2	1:227 381
Республика Бурятия	983 276	2	2	1:491 638
Владимирская область	1 365 825	2	2	1:682 913
Воронежская область	2 327 843	2	2	1:1 163 922
Калининградская область	1 002 187	2	2	1:501 094
Кемеровская область	2 674 283	2	2	1:1 337 142
Республика Марий Эл	680 397	2	2	1:340 199
Республика Мордовия	795 502	2	2	1:397 751
Новосибирская область	2 793 389	2	2	1:1 396 695
Омская область	1 944 225	2	2	1:972 113
Приморский край	1 902 719	2	2	1:951 360
Ростовская область	4 202 337	2	2	1:2 101 169
Рязанская область	1 114 137	2	2	1:557 069
Тамбовская область	1 015 981	2	2	1:507 991
Республика Татарстан	3 898 700	2	2	1:1 949 350
Ярославская область	1 259 612	2	2	1:629 806
Архангельская область	1 144 119	1	1	1:1 144 119
Астраханская область	1 014 065	1	1	1:1 014 065

Субъект	Численность населения	Число семей	Число случаев	Частота в субъекте*
Забайкальский край	1 065 785	1	1	1:1 065 785
Ивановская область	1 004 192	1	1	1:1 004 192
Республика Ингушетия	497 393	1	1	1:497 393
Республика Калмыкия	272 647	1	1	1:272 647
Карачаево-Черкесская Республика	465 563	1	1	1:465 563
Республика Крым и Севастополь	2 355 027	1	1	1:2 355 027
Липецкая область	1 144 055	1	1	1:1 144 055

Примечание. *На основе выборки пациентов, обследованных в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

При переходе на уровень федеральных округов становится очевидно, что около половины всех детей с генетически обусловленными КМП проживают в Центральном федеральном округе (82/45,8%), в Приволжском федеральном округе проживает 33 (18,4%) ребенка, в Южном федеральном округе проживает 21 (11,7%) ребенок с генетически обусловленными КМП. В каждом из остальных федеральных округов проживают менее 10% пациентов с генетически обусловленными КМП из обследованных нами (табл. 69).

Таблица 69. Распределение обследованных пациентов с генетически обусловленной КМП в различных федеральных округах РФ

Федеральный округ	Численность населения	Число семей	Число пациентов	Частота в округе*
Центральный	39 378 947	81	82	1:428 032
Приволжский	29 397 227	33	33	1:890 825
Южный	16 454 580	21	21	1:822 729
Сибирский	17 173 185	12	13	1:1 321 014
Северо-Кавказский	9 866 370	11	11	1:896 943
Уральский	12 350 131	7	8	1:1 543 766
Дальневосточный	8 188 594	7	7	1:1 169 799
Северо-Западный	13 972 061	4	4	1:3 493 015

Примечание. *На основе выборки пациентов, обследованных в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

Результаты проведенного молекулярно-генетического исследования позволили впервые описать относительные частоты различных типов генетически обусловленных КМП у детей в РФ [56] (рис. 93).

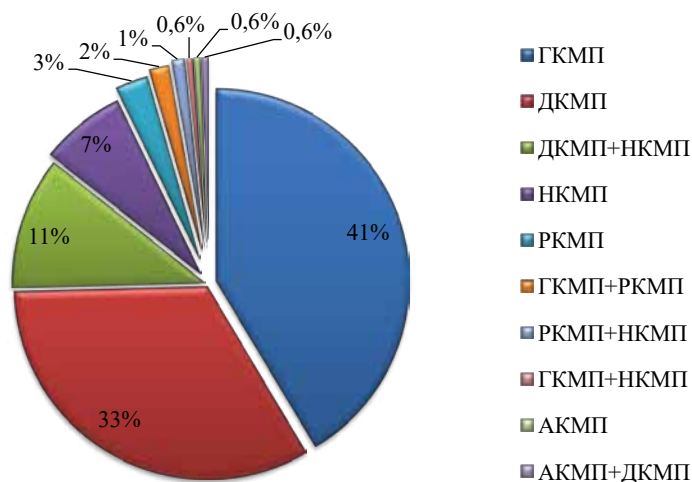


Рис. 93. Доли различных типов генетически обусловленных КМП у обследованных российских детей

Наиболее распространенной формой КМП, подтвержденной у 75 (41,4%) обследованных детей, является ГКМП. Второй по относительной частоте оказалась ДКМП, обнаруженная у 60 (33,1%) подтвержденных пациентов. Смешанный фенотип ДКМП и НКМП был диагностирован у 20 (11,1%) пациентов с генетически обусловленной КМП, тогда как НКМП имела генетическое подтверждение у 13 (7,2%) обследованных пациентов. Остальные типы генетически обусловленных КМП были обнаружены с долями менее 5% (см. рис. 93). В иностранной литературе описаны несколько крупномасштабных молекулярно-генетических исследований КМП, проведенных на педиатрических когортах пациентов, в которых были получены схожие данные, описывающие преимущественную встречаемость ДКМП и ГКМП среди подтвержденных пациентов, а также значительное число случаев смешанной КМП, что несвойственно большинству взрослых пациентов [495, 570]. Небольшие доли генетически обусловленных АКМП и РКМП, по всей видимости, связаны с редкостью этих форм КМП в педиатрической когорте больных, что также совпадает с зарубежными исследованиями [1087].

Анализ генетических особенностей развития КМП позволил описать распределение мутаций 38 генов у 179 детей (рис. 94) и протяженной делеции хромосомной области 1p36 еще у двух детей. Важно отметить, что патогенные варианты генома, описанные в базе дан-

ных HGMD, с популяционными частотами $<0,01\%$ были обнаружены у 104 (57,5%) обследованных пациентов, что соответствует выявляемости описанных мутаций в зарубежных исследованиях, проведенных на панелях с похожим набором таргетных областей генома [693].

Из представленных данных следует, что 88 пациентов, составляющих около половины (48,6%) всех обследованных нами детей с выявленными мутациями, несут в своем геноме патогенные и вероятно патогенные варианты генов *MYH7*, *MYBPC3* и *TPM1*, что в целом коррелирует с крупномасштабными многоцентровыми исследованиями генетически обусловленных КМП, проведенными за рубежом [206, 999].

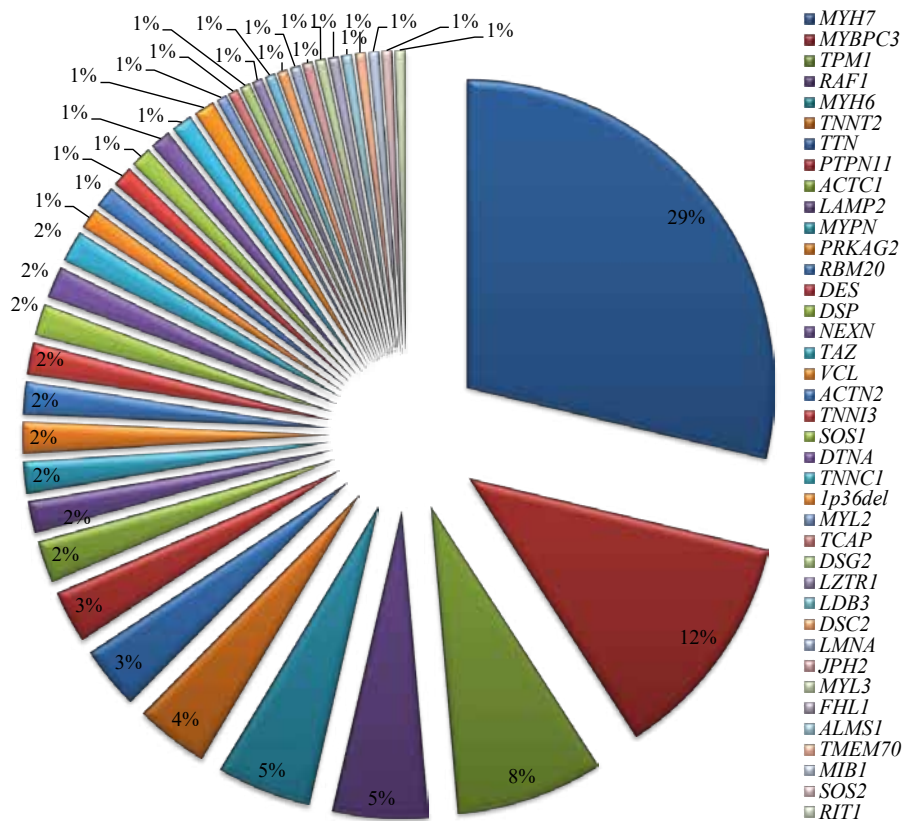


Рис. 94. Доли мутаций 38 генов и хромосомной области 1p36 у обследованных российских детей с генетически обусловленными КМП

Чаще других встречались мутации гена *MYH7*, вызвавшие генетически обусловленные КМП у 52 (28,7%) пациентов (см. рис. 94). Мутации этого гена отличались наибольшим разнообразием: среди 35 (20,1%) различных выявленных вариантов 13 (37,1%) оказались не опи-

санними ранее в базе данных HGMD. Это два патогенных миссенс-варианта: *c.727C>A*, *p.R243S* (PS2, PM2, PM5, PP3, PP4) и *c.2512C>T*, *p.P838S* (PS2, PM2, PM5, PP3, PP4), а также 10 вероятно патогенных миссенс-вариантов: *c.737A>G*, *p.K246R* (PM2, PM5, PP3, PP4); *c.839A>G*, *p.E280G* (PM1, PM2, PP3, PP4); *c.1441A>C*, *p.T481P* (PS2, PM2, PP3, PP4); *c.1628C>T*, *p.A543V* (PM1, PM2, PP3, PP4); *c.2372A>C*, *p.Q791P* (PM1, PM2, PP3, PP4); *c.2523G>C*, *p.K841N* (PM1, PM2, PP3, PP4); *c.2527G>A*, *p.A843T* (PM1, PM2, PP3, PP4); *c.2678C>A*, *p.A893E* (PM1, PM2, PM5, PP3, PP4); *c.2689A>C*, *p.N897H* (PM1, PM2, PP3, PP4); *c.3926C>T*, *p.T1309I* (PS2, PM2, PP3, PP4) и один патогенный нонсенс-вариант: *c.3706G>T*, *p.E1236** (PVS1, PM2, PP4). Девять новых вариантов гена *МУН7* являются синглтонами. В ходе исследования было обнаружено, что мутация *c.1357C>A*, *p.R453S*, описанная ранее у пациентов с ГКМП [999], встретилась у 5 (9,6%) детей из Ингушетии, Дагестана, Омской области, Ханты-Мансийского автономного округа и Москвы с фенотипом ГКМП, мутация *c.602T>C*, *p.I201T*, описанная ранее у пациентов с ДКМП [988], была выявлена нами у трех пациентов из Брянской, Псковской областей и Приморского края с фенотипом ДКМП и у двух детей со смешанным фенотипом ДКМП и НКМП из Челябинской и Самарской областей. Патогенный вариант *c.2710C>T*, *p.R904C*, описанный ранее у пациентов с НКМП [979], был обнаружен у 3 (5,8%) детей, двое из которых обладали смешанным фенотипом ДКМП и НКМП, а третий – ДКМП. Остальные мутации встретились с долями менее 5% (рис. 95).

Наибольшее число (16/45,7%) вариантов гена *МУН7* было выявлено у 23 (44,2%) детей с фенотипом ГКМП, 10 (28,6%) различных вариантов гена *МУН7* были обнаружены у 13 (25,0%) обследованных детей с фенотипом ДКМП, 6 (17,1%) вариантов гена *МУН7* были найдены у 8 (15,4%) пациентов со смешанным фенотипом ДКМП и НКМП, другие 5 (14,3%) вариантов удалось обнаружить у 5 (9,6%) детей с НКМП, два (5,7%) варианта были выявлены у двух (3,9%) детей с РКМП и один (2,9%) вариант – у ребенка со смешанным фенотипом ГКМП и НКМП. Для подавляющего большинства детей с мутациями гена *МУН7* генотип-фенотипические корреляции строго совпадали с корреляциями, описанными в базе данных HGMD. Однако в единичных случаях фенотип наших детей, совпадающий с фенотипом, описанным в литературе, дополнялся НКМП. Лишь в одном случае мутация *c.2302G>A*, *p.V768R*, описанная ранее у пациентов с ГКМП [669], не совпадала с фенотипом нашего ребенка, соответствующего рестриктивному фенотипу [54].

Вторыми по относительной частоте среди всех исследованных генов, вызывающих развитие КМП у обследованных нами детей, оказались мутации гена *МУВРС3*, явившиеся причиной генетически обусловленных КМП у 22 (12,2%) пациентов (см. рис. 94). Из 22 (12,6%) различных

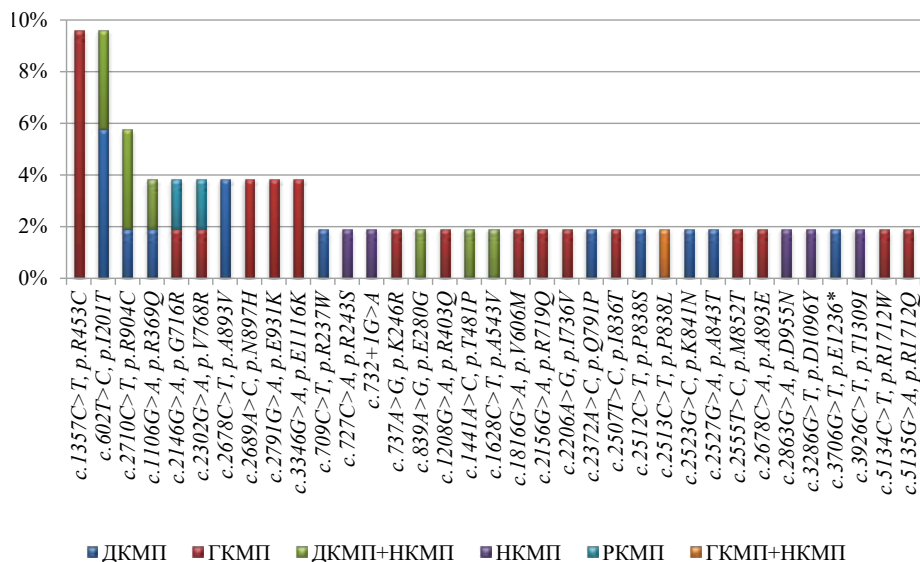


Рис. 95. Относительные частоты и спектр выявленных мутаций гена MYH7 у российских детей с генетически обусловленными КМП

вариантов гена *MYBPC3* (рис. 96) 5 (22,7%) вариантов не были описаны в базе HGMD ранее. Это один патогенный миссенс-вариант: *c.1505G>C*, *p.R502Q* (PS1, PM1, PM2, PM5, PP3, PP4), один вероятно патогенный миссенс-вариант: *c.3197C>G*, *p.P1066R* (PM2, PP1, PP3, PP4, PP5) и один миссенс-вариант с неизвестной патогенностью: *c.3384G>C*, *p.E1128D* (PM2, PP3, PP4), один патогенный нонсенс-вариант *c.1855G>T*, *p.E619** (PVS1, PM2, PP4) и один патогенный вариант гена *MYBPC3*, оказывающий влияние на сплайсинг: *c.2906-2A>C* (PVS1, PM2, PP4). Все эти варианты за исключением *c.3384G>C*, *p.E1128D* являются синглтонами, при этом вариант *c.1505G>C* вызывает замену аминокислотных остатков *p.R502Q*, описанную ранее у пациентов с ГКМП [999]. Нонсенс-мутация *c.3697C>T*, *p.Q1233**, описанная ранее у пациентов с ГКМП [304], была единственной мутацией гена *MYBPC3*, встретившейся у трех неродственных пациентов, двое из которых страдали ГКМП, а третий имел смешанный фенотип: ДКМП и НКМП и мутацию *c.772G>A*, *p.E258K* в компаунд-гетерозиготном состоянии. Все трое пациентов были из Москвы. По два раза встретились варианты *c.772G>A*, *p.E258K*; *c.1351+2T>C*; *c.1483C>T*, *p.R495W* и *c.2308G>A*, *p.D770N*. Три последних варианта были выявлены у пациентов с ГКМП, тогда как первый вариант – у пациента с ГКМП и пациента с ДКМП и НКМП, описанного выше. К моменту написания этой главы в базе данных OMIM не было описано аутосомно-рецессивное наследование мутаций гена *MYBPC3*, однако среди обследованных нами детей



компаунд-гетерозиготные варианты были выявлены еще у пятерых пациентов. Это мутации *c.1928-2A>G* и *c.3197C>G*, *p.P1066R*, первая из которых аннотирована в HGMD как мутация, вызывающая ГКМП и обнаруженная нами у ребенка из Ханты-Мансийского автономного округа со смешанным фенотипом ДКМП и НКМП; *c.1468G>A*, *p.G490R* и *c.3811C>T*, *p.R1271**, аннотированные в HGMD как мутации, вызывающие ГКМП и обнаруженные нами у ребенка с ГКМП из Москвы; *c.787G>A*, *p.G263R* и *c.2827C>T*, *p.R943**, также описанные в HGMD у больных с ГКМП и выявленные нами у ребенка с ГКМП из Забайкальского края; *c.557C>T*, *p.P186L* и *c.2610del*, *p.S871Afs*8*, описанные в HGMD у больных с ГКМП и найденные нами у ребенка из Краснодарского края с фенотипом ГКМП; а также *c.1483C>T*, *p.R495W* и *c.2308G>A*, *p.D770N*, описанные в HGMD у больных с ГКМП и найденные нами у ребенка с фенотипом ГКМП. Необходимо отметить, что все шестеро детей демонстрировали тяжелую клиническую картину ГКМП, пятеро из которых манифестировали с рождения, что коррелирует с компаунд-гетерозиготным и гомозиготным обладанием мутациями у детей с различными фенотипами КМП, опубликованными ранее [1048]. Отсутствие информации о рецессивных мутациях гена *MYBPC3* в базе данных OMIM может быть связано как с малочисленностью исследований, проведенных на педиатрических когортах больных, так и с относительной редкостью самих больных, несущих в своем геноме биаллельные мутации одного гена.

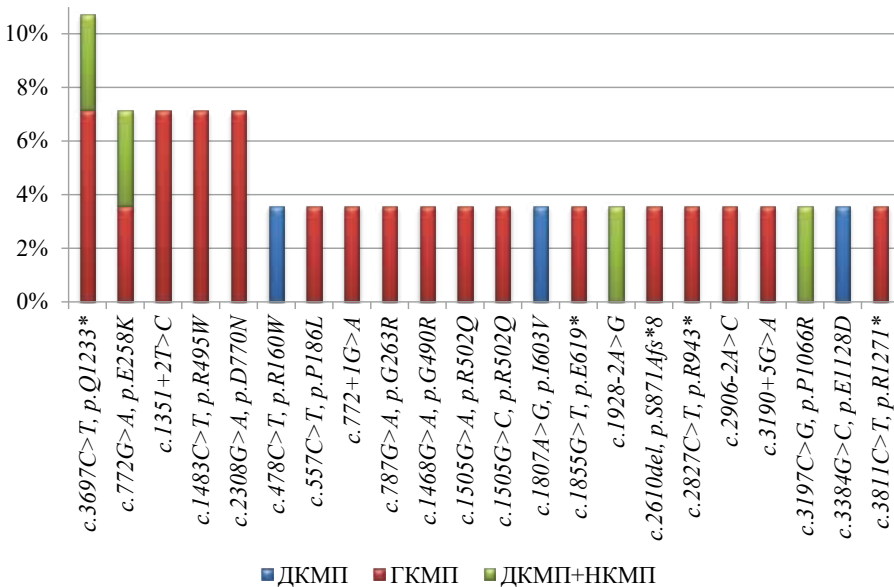


Рис. 96. Относительные частоты и спектр выявленных мутаций гена *MYBPC3* у российских детей с генетически обусловленными КМП

Из рис. 96 очевидно, что наибольшее число (17/77,3%) вариантов гена *MYBP3* было выявлено у 17 (77,3%) детей с фенотипом ГКМП, 4 (18,2%) различных варианта гена *MYBP3* были обнаружены у 2 (9,1%) обследованных детей со смешанным фенотипом ДКМП и НКМП, тогда как 3 (13,6%) варианта гена *MYBP3* были найдены у детей с ДКМП.

Фенотип большинства детей с мутациями гена *MYBP3* совпадал с фенотипом пациентов, описанным в базе данных HGMD для тех же патогенных вариантов. Однако в одном случае смешанный фенотип ДКМП/НКМП ребенка, вызванный описанным патогенным вариантом *c.1928-2A>G* и вероятно патогенным вариантом *c.3197C>G*, *p.P1066R*, не описанным ранее, не совпадал с аннотацией первого, описывающей ГКМП [999]. Вероятно, что новый вариант гена *MYBP3* может являться причиной этого несовпадения.

Мутации гена *TRPM1* обусловили развитие КМП у 14 (7,7%) детей (см. рис. 94). Среди выявленных нами 11 (6,3%) различных вариантов гена *TRPM1* 7 (63,6%) вариантов не были описаны в базе данных HGMD ранее. Это два патогенных миссенс-варианта: *c.4G>A*, *p.D2N* (PS2, PM1, PM2, PP3, PP4); *c.76G>A*, *p.E26K* (PS2, PM2, PM5, PP3, PP4); четыре вероятно патогенных миссенс-варианта: *c.218T>A*, *p.L73Q* (PS2, PM2, PP3, PP4); *c.287A>T*, *p.E96V* (PM1, PM2, PP3, PP4); *c.337C>T*, *p.L113F* (PM1, PM2, PM5, PP4); *c.758T>C*, *p.I253T* (PM1, PM2, PP3, PP4, PP5); один миссенс-вариант с неизвестной патогенностью: *c.398G>A*, *p.R133Q* (PM2, PP3, PP4), каждый из которых был обнаружен в единственном числе, и одна вероятно патогенная делеция *c.20_22del*, *p.K7del* (PM1, PM2, PM4, PP4). Наиболее частой мутацией, встретившейся у трех пациентов, двое из которых были близнецами из Челябинской области с НКМП, а третий из Волгоградской области с фенотипом ДКМП, оказалась миссенс-мутация *c.725C>T*, *p.A242V*, описанная ранее у пациентов с НКМП [942, 999]. Мутация *c.688G>A*, *p.D230N*, описанная ранее у пациентов с ДКМП [560, 999], была обнаружена нами у двух родных братьев с фенотипом ДКМП. Остальные мутации встретились с долями менее 10% (рис. 97).

Шестеро (42,9%) детей с пятью различными вариантами гена *TRPM1* обладали фенотипом ДКМП, двое других детей с двумя различными вариантами гена *TRPM1* обладали смешанным фенотипом ДКМП/НКМП, еще у двух детей с двумя различными вариантами гена *TRPM1* был описан смешанный фенотип ГКМП/РКМП, у двух родных сестер с одной мутацией гена *TRPM1* описан НКМП, наконец, два разных варианта того же гена были выявлены у двух детей с фенотипами ГКМП и РКМП/НКМП.



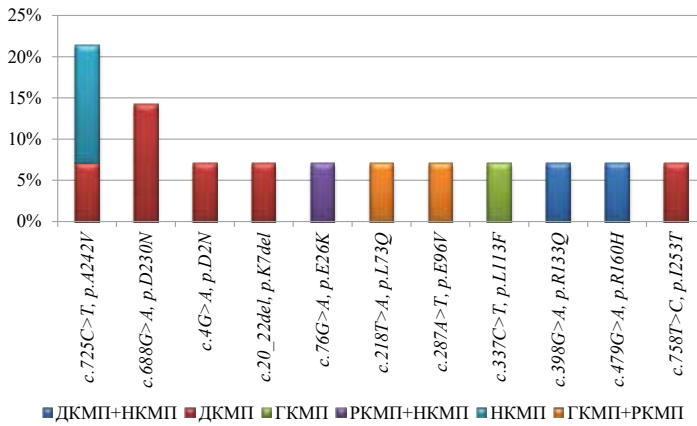


Рис. 97. Относительные частоты и спектр выявленных мутаций гена *TRPM1* у российских детей с генетически обусловленными КМП

У 9 (5,0%) детей из неродственных семей были выявлены 8 (4,6%) вариантов гена *MYH6* (см. рис. 94). При этом 5 (62,5%) обнаруженных вариантов не были описаны ранее в базе данных HGMD. Это два вероятно патогенных миссенс-варианта: *c.1360C>T, p.R454W* (PS2, PM2, PP3, PP4); *c.2363C>T, p.T788M* (PS2, PM2, PP3, PP4), и два варианта с неизвестной патогенностью: *c.2266A>C, p.N756H* (PM2, PP1, PP3, PP4); *c.3473C>T, p.A1158V* (PM2, PP1, PP3, PP4), а также патогенный нонсенс-вариант *c.1875C>A, p.Y625** (PVS1, PM2, PP4). Все найденные варианты гена *MYH6*, за исключением *c.3195G>C, p.Q1065H*, описанного ранее у пациентов с ГКМП [208], встретились единожды у детей с различными фенотипами КМП, демонстрируя преимущественно равномерное распределение аллелей (рис. 98).

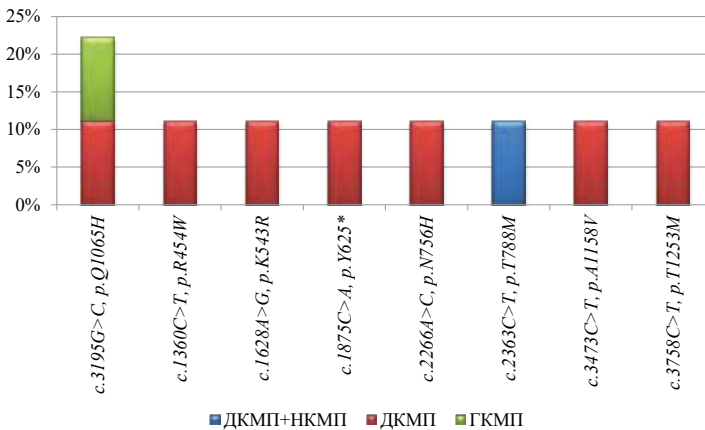


Рис. 98. Относительные частоты и спектр выявленных мутаций гена *MYH6* у обследованных нами детей с генетически обусловленными КМП

Семеро (77,8%) детей с мутациями гена *MYH6* имели фенотип ДКМП, один пациент обладал смешанным фенотипом ДКМП и НКМП, КМП еще одного ребенка сопровождалась гипертрофическим фенотипом.

У 7 (3,9%) пациентов, не состоящих между собой в родстве, были выявлены 6 (3,5%) различных вариантов гена *TNNT2* (см. рис. 94). При этом лишь один вариант с неизвестной клинической значимостью *c.775G>C, p.D259H* (PM2, PP3, PP4) не был описан ранее в базе данных HGMD, тогда как патогенный вариант *c.451del, p.R151Gfs*41*, описанный ранее у детей с ДКМП и ГКМП [662, 978], встретился нами у двух мальчиков с некомпактным миокардом из Нижегородской области и Республики Крым. Остальные варианты гена *TNNT2* встретились единожды (рис. 99).

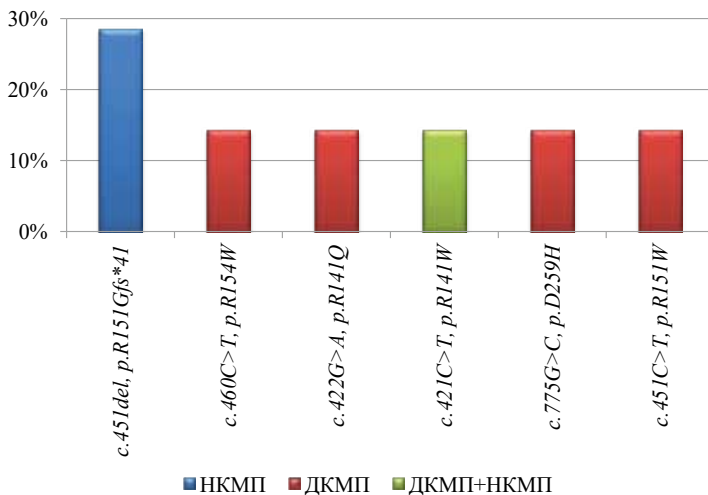


Рис. 99. Относительные частоты и спектр выявленных мутаций гена *TNNT2* у обследованных нами детей с генетически обусловленными КМП

Четверо (57,1%) детей с мутациями гена *TNNT2* имели фенотип ДКМП, двое – НКМП и один ребенок – ДКМП с НКМП.

Четыре (2,3%) различных варианта гена *RAF1* были выявлены у 9 (5,0%) неродственных детей (см. рис. 100). Из них лишь одна патогенная делеция *c.741_776del, p.E248_S259del* (PS2, PM1, PM2, PM4, PP4) не была описана в базе HGMD ранее.

Все дети с мутациями гена *RAF1* обладали фенотипом ГКМП. Из представленных на рис. 100 данных следует, что патогенный вариант *c.770C>T, p.S257L*, описанный ранее у пациентов с ГКМП и синдромом Нунан [20, 939] и выявленный нами у 6 (66,7%) пациентов, может считаться мажорным вариантом гена *RAF1* среди российских детей с ГКМП.

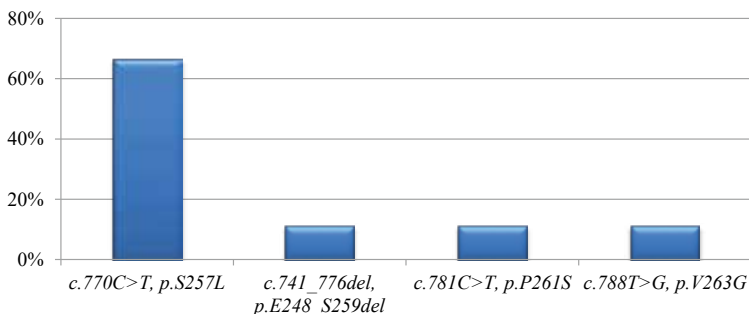


Рис. 100. Относительные частоты и спектр выявленных мутаций гена *RAF1* у обследованных нами детей с генетически обусловленными КМП

Четыре варианта (2,3%) гена *TTN* были обнаружены у шести (3,3%) детей (см. рис. 94). При этом все четыре варианта не были описаны в базе HGMD ранее. Это два патогенных нонсенс-варианта: *c.13696C>T, p.Q4566** (PVS1, PM2, PP4), выявленный трижды: у двух братьев из Орловской области и девочки из Москвы и *c.105048C>A, p.C35016** (PVS1, PM2, PP4), выявленный у ребенка из Калужской области; патогенная дупликация *c.87040dup, p.R29014Pfs*5* (PVS1, PM2, PP4), обнаруженная у мальчика из Брянской области, а также патогенная делеция/вставка *c.71028_71029delinsC, p.Q23676Hfs*16* (PVS1, PM2, PP4) у мальчика из Воронежской области (рис. 101).

У 5 (83,3%) детей с мутациями в гене *TTN* на эхо-КГ выявлялся ДКМП, тогда как у шестого ребенка был смешанный фенотип ДКМП и НКМП. Литературные данные подтверждают тенденцию к накоплению мутаций гена *TTN* преимущественно пациентами с ДКМП, причем большинство этих пациентов обладают вариантами, приводящими к усечению кодируемого белка [431], что и было продемонстрировано в нашем исследовании.

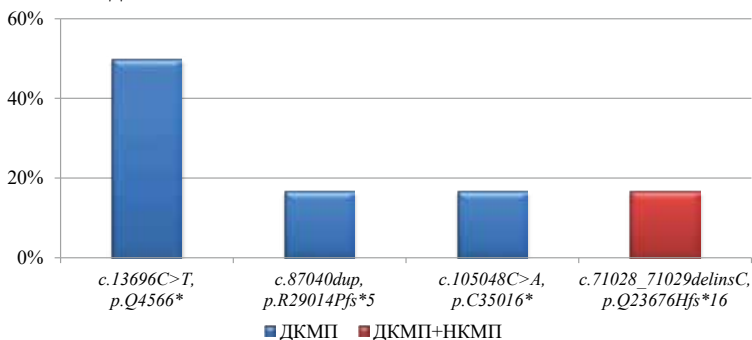


Рис. 101. Относительные частоты и спектр выявленных мутаций гена *TTN* у обследованных нами детей с генетически обусловленными КМП

Мутации гена *PTPN11* были обнаружены у 5 (2,8%) детей с генетически обусловленными КМП (см. рис. 94). При этом все 5 (2,9%) различных вариантов гена были описаны в базе данных HGMD. Равномерное распределение обнаруженных вариантов в неродственных семьях и незначительное число детей, в геноме которых были выявлены варианты гена *PTPN11*, не позволили определить мутации, характерные для российских детей с генетически обусловленными КМП.

Все пятеро детей с мутациями гена *PTPN11* имели фенотип ГКМП, обусловленный в четырех случаях синдромом Нунан и в одном случае – синдромом Леопард. Примечательно, что в случае двух детей в возрасте двух и четырех месяцев синдром Нунан не был заподозрен до проведения настоящего исследования, что подчеркивает практическую ценность разработанного метода диагностики [13].

Мутации гена *ACTC1* были выявлены у 4 (2,2%) детей из неродственных семей (см. рис. 94). При этом три варианта (75,0%) из четырех (2,3%) обнаруженных не были описаны ранее в базе данных HGMD. Это вероятно патогенные миссенс-варианты: *c.477T>A*, *p.D159E* (PS2, PM2, PP3, PP4); *c.664G>A*, *p.A222T* (PM1, PM2, PP3, PP4); *c.758G>T*, *p.G253V* (PS2, PM1, PM2, PP3, PP4). Все эти варианты гена *ACTC1* являются синглтонами. Все четыре найденные варианта встретились в единичном числе у пациентов с различными КМП, демонстрируя равномерное распределение аллелей (рис. 102).

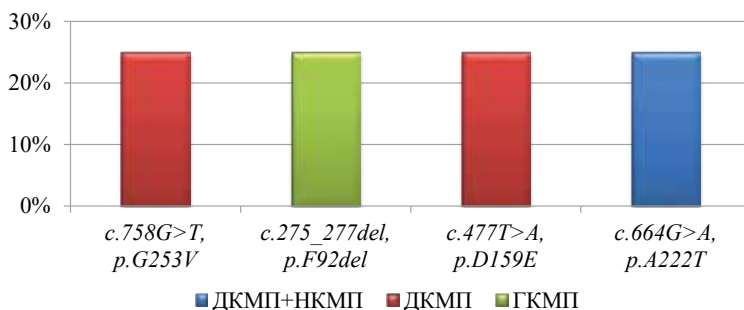


Рис. 102. Относительные частоты и спектр выявленных мутаций гена *ACTC1* у обследованных нами детей с генетически обусловленными КМП

Трое пациентов с мутациями гена *ACTC1* обладали фенотипом ДКМП, при этом у двух из них фенотип ДКМП сопровождался НКМП, тогда как один пациент обладал фенотипом ГКМП.

Мутации в каждом из следующих генов: *LAMP2*, *MYPN*, *PRKAG2*, *RBM20*, *DES*, *DSP*, *NEXN* и *TAZ* удалось выявить у 3 (1,7%) обследованных пациентов, мутации в каждом из следующих генов: *VCL*, *ACTN2*,

TNNI3, *SOS1*, *DTNA* и *TNNC1* – были найдены у 2 (1,1%) детей, мутации в каждом из генов: *MYL2*, *TCAP*, *DSG2*, *LZTR1*, *LDB3*, *DSC2*, *LMNA*, *JPH2*, *MYL3*, *FHL1*, *ALMS1*, *TMEM70*, *MIB1*, *SOS2* и *RIT1* были выявлены у единичных детей с генетически обусловленными КМП (см. рис. 94). Среди всех обнаруженных нуклеотидных вариантов этих генов 49 вариантов не аннотированы в информационной базе HGMD (табл. 70). Опровержение генотип-фенотипических корреляций, описанных ранее, было обнаружено для мутации *c.1360C>T*, *p.R454W* гена *DES*, выявленной нами у ребенка с РКМП и описанной ранее у пациентов с ДКМП [975], либо ГКМП [423]. Интересно отметить, что среди 104 пациентов с мутациями, аннотированными в базе данных HGMD, фенотип 99 детей совпадал с описанным ранее, тогда как фенотип лишь пяти обследованных нами пациентов не соответствовал фенотипу пациентов, обладающих такими же мутациями, описанному ранее, что может свидетельствовать о высокой вероятности правильного предсказания фенотипа КМП на основании результатов молекулярно-генетического исследования, проведенного до развития характерных клинических проявлений.

Таблица 70. Патогенные, вероятно патогенные нуклеотидные варианты, а также варианты с неизвестной клинической значимостью, не аннотированные ранее в базе данных HGMD, выявленные у детей с КМП. Корреляции генотипа и фенотипа

Ген	Нуклеотидный, аминокислотный вариант	Критерии патогенности	Фенотип
<i>ACTC1</i>	<i>c.664G>A</i> , <i>p.A222T</i>	Вероятно патогенный	ДКМП+НКМП
<i>ACTC1</i>	<i>c.477T>A</i> , <i>p.D159E</i>	Вероятно патогенный	ДКМП
<i>ACTC1</i>	<i>c.758G>T</i> , <i>p.G253V</i>	Вероятно патогенный	ДКМП
<i>ACTN2</i>	<i>c.1002G>C</i> , <i>p.K334N</i>	Патогенность неизвестна (PM2, PP3, PP4)	ДКМП
<i>ACTN2</i>	<i>c.2082G>C</i> , <i>p.K694N</i>	Патогенность неизвестна (PM2, PP3, PP4)	ГКМП
<i>ALMS1</i>	<i>c.1063C>T</i> , <i>p.Q355*</i>	Патогенный (PVS1, PM2, PP4)	ДКМП
<i>DES</i>	<i>c.353G>C</i> , <i>p.R118P</i>	Патогенность неизвестна (PM2, PP3, PP4)	ДКМП

Продолжение таблицы 70

Ген	Нуклеотидный, аминокислотный вариант	Критерии патогенности	Фенотип
<i>DES</i>	<i>c.1132A>G, p.K378E</i>	Вероятно патогенный (PM1, PM2, PP3, PP4)	РКМП+НКМП
<i>DSC2</i>	<i>c.595C>T, p.R199C</i>	Патогенность неизвестна (PM2, PP4)	ДКМП
<i>DSP</i>	<i>c.815T>G, p.L272R</i>	Вероятно патогенный (PM1, PM2, PP3, PP4)	ДКМП
<i>DSP</i>	<i>c.3313_3318del, p.K1105_E1106del</i>	Вероятно патогенный (PM1, PM2, PM4, PP4)	ДКМП
<i>DSP</i>	<i>c.5004dup, p.L1669Tfs*15</i>	Патогенный (PVS1, PM2, PP4)	ДКМП+НКМП
<i>DSP</i>	<i>c.4354A>T, p.R1452*</i>	Патогенный (PVS1, PM2, PP4)	ДКМП+НКМП
<i>DTNA</i>	<i>c.445A>G, p.R149G</i>	Вероятно патогенный (PM1, PM2, PP3, PP4)	ДКМП
<i>DTNA</i>	<i>c.937C>A, p.R313S</i>	Патогенность неизвестна (PM2, PP3, PP4)	ДКМП
<i>FHL1</i>	<i>c.4del, p.A2Rfs*28</i>	Патогенный (PVS1, PM2, PP4)	ГКМП+РКМП
<i>JPH2</i>	<i>c.611T>G, p.L204R</i>	Патогенность неизвестна (PM2, PP3, PP4)	ДКМП
<i>LAMP2</i>	<i>c.889_891del, p.K297del</i>	Вероятно патогенный (PS2, PM2, PM4, PP4)	ГКМП
<i>LAMP2</i>	<i>c.893_923del, p.E298Afs*38</i>	Патогенный (PVS1, PM2, PP4)	ГКМП
<i>LAMP2</i>	<i>c.733C>T, p.Q245*</i>	Патогенный (PVS1, PM2, PP4)	ГКМП
<i>LDB3</i>	<i>c.1834G>A, p.A612T</i>	Патогенность неизвестна (PM2, PP3, PP4)	НКМП
<i>LZTR1</i>	<i>c.1259A>G, Q420R</i>	Патогенность неизвестна (PM2, PP3, PP4)	ГКМП
<i>LZTR1</i>	<i>c.2051T>C, p.I684T</i>	Патогенность неизвестна (PM2, PP3, PP4)	ГКМП



Продолжение таблицы 70

Ген	Нуклеотидный, аминокислотный вариант	Критерии патогенности	Фенотип
<i>MIB1</i>	<i>c.461del, p.G154Vfs*25</i>	Патогенный (PVS1, PM2, PP4)	НКМП
<i>MYBPC3</i>	<i>c.1505G>C, p.R502Q</i>	Патогенный	ГКМП
<i>MYBPC3</i>	<i>c.1855G>T, p.E619*</i>	Патогенный	ГКМП
<i>MYBPC3</i>	<i>c.2906-2A>C</i>	Патогенный	ГКМП
<i>MYBPC3</i>	<i>c.3384G>C, p.E1128D</i>	Патогенность неизвестна	ДКМП
<i>MYBPC3</i>	<i>c.3197C>G, p.P1066R</i>	Вероятно патогенный	ДКМП+НКМП
<i>MYH6</i>	<i>c.1875C>A, p.Y625*</i>	Патогенный	ДКМП
<i>MYH6</i>	<i>c.2363C>T, p.T788M</i>	Вероятно патогенный	ДКМП+НКМП
<i>MYH6</i>	<i>c.1360C>T, p.R454W</i>	Вероятно патогенный	ДКМП
<i>MYH6</i>	<i>c.2266A>C, p.N756H</i>	Патогенность неизвестна	ДКМП
<i>MYH6</i>	<i>c.3473C>T, p.A1158V</i>	Патогенность неизвестна	ДКМП
<i>MYH7</i>	<i>c.727C>A, p.R243S</i>	Патогенный	НКМП
<i>MYH7</i>	<i>c.737A>G, p.K246R</i>	Вероятно патогенный	ГКМП
<i>MYH7</i>	<i>c.839A>G, p.E280G</i>	Вероятно патогенный	ДКМП+НКМП
<i>MYH7</i>	<i>c.1441A>C, p.T481P</i>	Вероятно патогенный	ДКМП+НКМП
<i>MYH7</i>	<i>c.1628C>T, p.A543V</i>	Вероятно патогенный	ДКМП+НКМП
<i>MYH7</i>	<i>c.2372A>C, p.Q791P</i>	Вероятно патогенный	ДКМП
<i>MYH7</i>	<i>c.2512C>T, p.P838S</i>	Патогенный	ДКМП
<i>MYH7</i>	<i>c.2523G>C, p.K841N</i>	Вероятно патогенный	ДКМП
<i>MYH7</i>	<i>c.2527G>A, p.A843T</i>	Вероятно патогенный	ДКМП
<i>MYH7</i>	<i>c.2678C>A, p.A893E</i>	Вероятно патогенный	ГКМП
<i>MYH7</i>	<i>c.2689A>C, p.N897H</i>	Вероятно патогенный	ГКМП
<i>MYH7</i>	<i>c.3706G>T, p.E1236*</i>	Патогенный	ДКМП
<i>MYH7</i>	<i>c.3926C>T, p.T1309I</i>	Вероятно патогенный	НКМП
<i>MYL3</i>	<i>c.559+1G>A</i>	Патогенный (PVS1, PM2, PP4)	ДКМП
<i>MYPN</i>	<i>c.1995G>T, p.Q665H</i>	Вероятно патогенный (PS2, PM2, PP1, PP3, PP4)	ДКМП
<i>NEXN</i>	<i>c.799G>T, p.E267*</i>	Патогенный (PVS1, PM2, PP4)	ДКМП+НКМП

Продолжение таблицы 70

Ген	Нуклеотидный, аминокислотный вариант	Критерии патогенности	Фенотип
<i>NEXN</i>	<i>c.1582G>C, p.E528Q</i>	Патогенность неизвестна (PM1, PP3, PP4)	АКМП
<i>NEXN</i>	<i>c.1585C>A, p.Q529K</i>	Вероятно патогенный (PM1, PM2, PP3, PP4)	АКМП
<i>NEXN</i>	<i>c.1867C>T, p.Q623*</i>	Патогенный (PVS1, PM2, PP4)	ДКМП+НКМП
<i>NEXN</i>	<i>c.1876G>A, p.E626K</i>	Патогенность неизвестна (PM2, PP3, PP4)	ДКМП
<i>PRKAG2</i>	<i>c.1585-1G>A</i>	Патогенный (PVS1, PM2, PP4)	ГКМП
<i>RAF1</i>	<i>c.741_776del, p.E248_S259del</i>	Патогенный	ГКМП
<i>RBM20</i>	<i>c.325G>A, p.A109T</i>	Патогенность неизвестна (PM2, PP3, PP4)	ДКМП
<i>RBM20</i>	<i>c.1244G>A, p.S415N</i>	Патогенность неизвестна (PM2, PP3, PP4)	ДКМП
<i>RBM20</i>	<i>c.2737G>A, p.E913K</i>	Вероятно патогенный (PM1, PM2, PP3, PP4)	ДКМП+НКМП
<i>SOS1</i>	<i>c.940_943del, p.Q314Yfs*13</i>	Патогенный (PVS1, PM2, PP4)	ГКМП+НКМП
<i>TAZ</i>	<i>c.658G>A, p.G220R</i>	Патогенность неизвестна (PM2, PP3, PP4)	ДКМП+НКМП
<i>TAZ</i>	<i>c.711+5G>A</i>	Вероятно патогенный (PS2, PM2, PP4)	ДКМП
<i>TAZ</i>	<i>c.208del, p.E70Sfs*31</i>	Патогенный (PVS1, PM2, PP4)	ДКМП
<i>TNNC1</i>	<i>c.181A>G, p.I61V</i>	Вероятно патогенный (PS2, PM2, PP3, PP4)	ДКМП
<i>TNNC1</i>	<i>c.106A>G, p.I36V</i>	Вероятно патогенный (PS2, PM2, PP3, PP4)	ДКМП
<i>TNNT2</i>	<i>c.775G>C, p.D259H</i>	Патогенность неизвестна	ДКМП

Ген	Нуклеотидный, аминокислотный вариант	Критерии патогенности	Фенотип
<i>TRM1</i>	<i>c.218T>A, p.L73Q</i>	Вероятно патогенный	ГКМП+РКМП
<i>TRM1</i>	<i>c.76G>A, p.E26K</i>	Патогенный	ГКМП+РКМП
<i>TRM1</i>	<i>c.398G>A, p.R133Q</i>	Патогенность неизвестна	ДКМП+НКМП
<i>TRM1</i>	<i>c.287A>T, p.E96V</i>	Вероятно патогенный	ГКМП+РКМП
<i>TRM1</i>	<i>c.4G>A, p.D2N</i>	Патогенный	ДКМП
<i>TRM1</i>	<i>c.20_22del, p.K7del</i>	Вероятно патогенный	ДКМП
<i>TRM1</i>	<i>c.337C>T, p.L113F</i>	Вероятно патогенный	ГКМП
<i>TRM1</i>	<i>c.758T>C, p.I253T</i>	Вероятно патогенный	ДКМП
<i>TTN</i>	<i>c.87040dup, p.R29014Pfs*5</i>	Патогенный	ДКМП
<i>TTN</i>	<i>c.71028_71029delinsC, p.Q23676Hfs*16</i>	Патогенный	ДКМП+НКМП
<i>TTN</i>	<i>c.105048C>A, p.C35016*</i>	Патогенный	ДКМП
<i>TTN</i>	<i>c.13696C>T, p.Q4566*</i>	Патогенный	ДКМП
<i>VCL</i>	<i>c.1713del, p.A573Hfs*8</i>	Патогенный (PVS1, PM2, PP4)	ДКМП
<i>VCL</i>	<i>c.2746-4A>G</i>	Патогенность неизвестна (PM2, PP4)	ГКМП

Примечание. Биоинформатический анализ осуществлен согласно российскому Руководству по интерпретации данных [51] (критерии патогенности приведены в скобках для вариантов, не описанных выше).

Суммарно удалось выявить 173 нуклеотидных варианта в 39 различных исследованных генах и одну протяженную делецию хромосомной области 1р36. Среди них почти три четверти, а именно 125 (71,8%) вариантов, составили миссенсы, кроме того, было обнаружено 17 (9,8%) мутаций нарушающих сплайсинг, 15 (8,6%) делеций, 10 из которых приводят к сдвигу рамки считывания, 13 (7,5%) нонсенс-мутаций, и три (1,7%) небольшие вставки, две из которых сдвигают рамку считывания, а третья образует стоп кодон (рис. 103). При этом мутации, приводящие к преждевременной терминации трансляции, то есть мутации, кардинальным образом изменяющие длину кодируемого белка, были выявлены лишь у 24 (13,3%) пациентов.

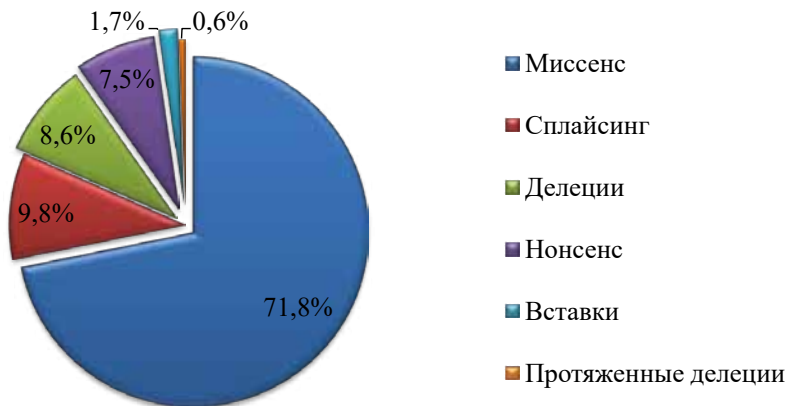


Рис. 103. Доли различных типов генетических вариантов, выявленных у 181 ребенка с генетически обусловленными КМП

4.6.3. ГЕНОТИП-ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ КОРРЕЛЯЦИИ

Мы постарались вычислить специфические генотип-фенотипические корреляции в когорте больных детей для дальнейшей оценки риска и прогнозирования определенных фенотипов, что имеет очевидную практическую значимость, а также позволяет улучшить отбор пациентов для усиления мониторинга и персонализированной терапии.

Для наиболее частых вариантов гена *MYH7*, обнаруженных нами у российских пациентов, были рассчитаны ассоциации с фенотипом КМП. В частности, достоверные ассоциации с гипертрофическим фенотипом были обнаружены у детей, имеющих мутацию *c.1357C>A* (табл. 71), тогда как с дилатационным фенотипом – у детей, имеющих мутацию *c.602T>C*, (табл. 72).

Достоверная ассоциация была обнаружена и у детей с гипертрофическим фенотипом и наличием хотя бы одной мутации гена *MYBPC3* (табл. 73).

Таблица 71. Расчет ассоциации мутации *c.1357C>A* гена *MYH7* с гипертрофическим фенотипом у российских детей с наследственно обусловленными КМП

Параметр	ГКМП		р-значение (критерий Фишера)
	есть	нет	
Мутация <i>c.1357C>A</i>	5	0	0,013
Другие мутации гена <i>MYH7</i>	18	29	

Таблица 72. Расчет ассоциации мутации с.602T>C гена МУН7 с дилатационным фенотипом у российских детей с наследственно обусловленными КМП

Параметр	ДКМП		р-значение (критерий Фишера)
	есть	нет	
Мутация с.602T>C	5	0	0,008
Другие мутации гена МУН7	16	31	

Таблица 73. Расчет ассоциации мутаций гена МУВРС3 с гипертрофическим фенотипом у российских детей с наследственно обусловленными КМП

Параметр	ГКМП		р-значение (критерий Фишера)
	есть	нет	
Мутации МУВРС3	17	5	<0,001
Мутации других генов	62	97	

Риск развития гипертрофического фенотипа у детей с мутациями гена МУВРС3 достоверно выше ОШ=5,27 (ДИ 1,8–15,9) по сравнению с любым другим фенотипом КМП, в том числе со смешанным.

Достоверная ассоциация была обнаружена у детей с ранней манифестацией первичной КМП и наличием хотя бы одной мутации, приводящей к преждевременной терминации трансляции. В частности, у носителей нонсенс-мутаций, мутаций, приводящих к сдвигу рамки считывания, а также мутаций, расположенных в канонических сайтах сплайсинга, КМП развивается в возрасте до 3 месяцев достоверно ($p=0,015$) чаще по сравнению с пациентами, геном которых содержит любые другие мутации ОШ=2,8 (ДИ 1,2–7,0) (табл. 74).

Таблица 74. Расчет ассоциации типа мутаций с возрастом манифестации первичной КМП у российских детей

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

В большинстве случаев ранняя манифестация КМП обусловливает 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 [1048]. Кроме того, удалось обнаружить высоко достоверные ($p < 0,001$) различия в возрасте дебюта КМП у этих детей по сравнению с группой пациентов с доминантными мутациями любых изученных генов, явившимися причиной развития первичной КМП (табл. 75).

Таблица 75. Расчет ассоциации типа наследования с возрастом манифестации первичной КМП у российских детей

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

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

Идентификация нескольких нуклеотидных вариантов генов объясняет лишь небольшую долю наблюдаемой клинической изменчивости среди пробандов. Плейотропный эффект мутаций, расположенных в одних и тех же генах и вызывающих различные формы КМП, может объясняться, в частности, тем фактом, что мутации в дискретных доменах кодируемого белка могут нарушать специфические функциональные свойства белка либо уникальные белок-белковые взаимодействия. При этом фенотипы могут различаться даже в семье с одной и той же мутацией, указывая на то, что изменение негенетических факторов, в том числе факторов окружающей среды, также способствует фенотипической изменчивости. Кроме того, множественные редкие варианты генома могут вносить свой совместный вклад в развитие болезни как в случаях наследственной природы КМП, так и в спорадических случаях, объясняя более сложную модель наследования при отсутствии клинических проявлений болезни у родителей. Поэтому в число рекомендаций

должно входить проведение регулярного клинического скрининга на КМП у бессимптомных родственников первой степени с подтвержденными патогенными вариантами генома, для которых была описана причинная связь с развитием КМП. Именно такое исследование способствовало выявлению изменений на эхо-КГ у одного из родителей шести пробандов, считавших себя здоровыми, из различных неродственных семей. В этой связи стоит отметить и гомозиготный сплайсинговый вариант *c.559+1G>A* гена *MYL3*, для мутаций которого в базе данных OMIM во время написания этой главы описано лишь аутосомно-доминантное наследование. Этот минорный аллель, поразивший обе хромосомы ребенка с тяжелым течением ДКМП, не был описан до проведения этого исследования ни в одной из информационных баз и был унаследован от каждого из родителей, состоящих в близкородственном браке и не имеющих ни клинических, ни функциональных проявлений КМП. Рецессивные мутации были выявлены еще у пяти детей в генах, для которых в базе данных OMIM описано рецессивное наследование. У девочки с синдромом Альстрема (возраст 1 год и 9 месяцев на момент проведения исследования) с фенотипом ДКМП, аффективно-респираторными пароксизмами, нистагмом и атрофией диска зрительного нерва были выявлены два патогенных варианта гена *ALMS1*: *c.1063C>T*, *p.Q355**, не описанные ранее, и *c.4150dup*, *p.T1384Nfs*15*, описанные при синдроме Альстрема. У мальчика с недостаточностью митохондриального комплекса V (возраст 4 года и 6 месяцев) со смешанным фенотипом ГКМП/НКМП, НРС, ВПС и выраженной мышечной гипотонией были обнаружены два патогенных варианта гена *TMEM70*: *c.317-2A>G* и *c.578_579del*, *p.T193Sfs*6*, описанных ранее. Еще у двух мальчиков (возраст 5 лет и 2 месяца, 7 лет и 8 месяцев) с фенотипом ДКМП, кардиофиброзом и изменениями кожного покрова по типу кератодермии были обнаружены два патогенных варианта гена *DSP*: *c.4354A>T*, *p.R1452** и *c.5004dup*, *p.L1669Tfs*15*, не описанных ранее, а также мутация *c.4198C>T*, *p.R1400** в гомозиготном состоянии, описанная ранее. У мальчика с синдромом Нунан, тип 2 (возраст 8 лет) ГКМП, НРС, ЗПМР, недостаточностью митрального и аортального клапанов, синкопальными состояниями, короткой широкой шеей с крыловидными складками были выявлены два не описанных ранее варианта гена *LZTR1* с неизвестной патогенностью: *c.1259A>G*, *Q420R* и *c.2051T>C*, *p.I684T*.

Необходимо отметить, что носительство единичных гетерозиготных вариантов генов также способно вызвать тяжелейшую клиническую картину болезни. Так, спонтанно возникшие варианты гена *MYH7* *c.2512C>T*, *p.P838S* и *c.2513C>T*, *p.P838L*, расположенные в одном кодоне, явились причиной развития выраженных, резистентных к проводимой терапии форм ДКМП и ГКМП соответственно и сопровождались летальным исходом обоих детей в возрасте до 2 лет. Первая

мутация была описана ранее при тяжелой форме ГКМП и РКМП [505], тогда как вторая мутация не была описана ранее. Ее патогенность была подтверждена биоинформатическим путем, а также анализом ее сегрегации в семье. Существенный процент мутаций, возникших спорадически, заставил нас проанализировать возможные триггеры окружающей среды, среди которых наиболее полно представлена информация о перенесенной вирусной инфекции на ранних стадиях развития плода. Выяснилось, что в группе детей с КМП, вызванными мутациями, возникшими спорадически, существует достоверная ассоциация ($p < 0,001$) с беременностями, протекавшими с ОРВИ на ранних стадиях развития эмбриона (табл. 76).

Таблица 76. 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	

Таким образом, дети, родившиеся в результате беременностей, сопровождающихся ОРВИ, обладают повышенным риском возникновения КМП, вызванного спонтанными мутациями, по сравнению с детьми с моногенными КМП, родившимися в результате беременностей, протекавших без ОРВИ ОШ=10,6 (ДИ 3,6–34,1), что может свидетельствовать в поддержку гипотезы о мутагенной активности, оказываемой различными вирусами на формирование генома эмбриона, в том числе во время гаметогенеза, за счет подавления системы репарации ДНК, призванной исправлять репликативные ошибки, возникающие во время клеточного деления и репликации ДНК.

В педиатрической практике, где КМП особенно гетерогенны, преимущество установления диагноза, подтвержденного на генетическом уровне, также важно для раннего и правильного лечения синдромальных, метаболических или нервно-мышечных случаев КМП. Выявленные генетические причины КМП позволили поставить диагнозы 19 (10,5%) пациентам с КМП, обусловленными синдромами Нунан и Леопард [1057], 7 (3,9%) пациентам с метаболическими болезнями, обусловленными болезнью Данон [12], синдромом Барта и болезнью накопления гликогена в сердце, 2 (1,1%) пациентам с синдромом делеции 1p36 [1058], одному пациенту с X-сцепленной миопатией и постуральной мышечной атрофией, а также одному пациенту с недостаточностью ядерного

митохондриального комплекса V, тип 2 [18]. Для этих 30 (16,6%) детей КМП были вторичны по отношению к основным болезням, поэтому выявление мутаций способствовало существенной корректировке их лечения [13]. В одном из исследований генетических причин КМП, проведенных на педиатрической когорте пациентов, также были получены сходные данные, указывающие на схожую частоту вторичных КМП [520].

4.6.4. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАЦИЙ ИЗУЧЕННЫХ ГЕНОВ В СООТВЕТСТВИИ С ЛОКАЛИЗАЦИЕЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫМ ВКЛАДОМ ИХ ПРОДУКТОВ

Кроме того, гены, содержащие мутации, были классифицированы в соответствии с функциональной принадлежностью их продуктов различным компонентам кардиомиоцитов (рис. 104) [373].

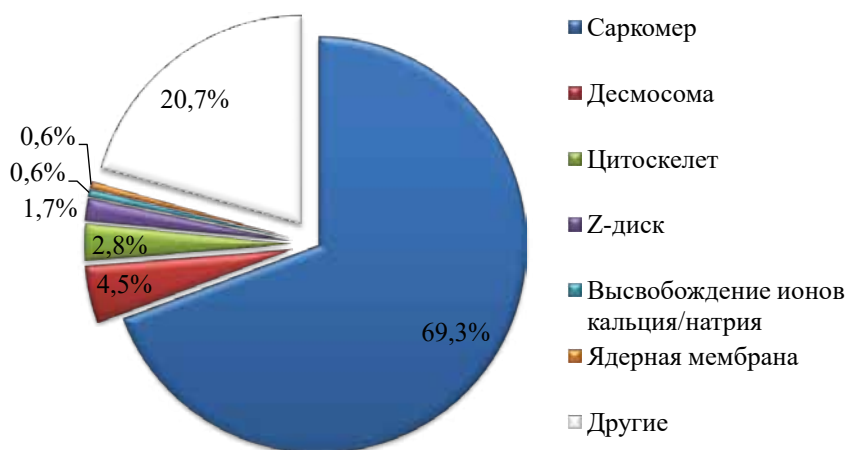


Рис. 104. Доли пациентов, распределенные в соответствии с функциональным вкладом продуктов генов, содержащих выявленные нуклеотидные варианты, в различные компоненты кардиомиоцитов.

Примечание. Гены были сгруппированы на основании функционального вклада их продуктов в различные компоненты кардиомиоцитов по семи группам (гены, кодирующие саркомерные белки; гены, кодирующие z-диск; гены, кодирующие цитоскелетные белки; гены, кодирующие белки, отвечающие за ионный обмен; гены, продукты которых формируют десмосому; гены, продукты которых формируют ядерную оболочку, и остальные гены).

Основываясь на этой классификации, с мутациями генов, кодирующих саркомерные белки, выявлено 124 (68,9%) ребенка, далее следуют группы генов, кодирующих белки десмосомы, – 8 (4,4%) детей, кодирующих белки цитоскелета – 5 (2,8%) детей и кодирующих белки z-диска – 3 (1,7%) ребенка. В группах генов, отвечающих за ионный обмен и ядерную оболочку, мутации были выявлены у единичных детей. Преобладание мутаций генов, кодирующих белки саркомера можно считать наиболее частым явлением для российских детей с генетически обусловленными моногенными КМП.

4.6.5. ОПИСАНИЕ НОВЫХ ВАРИАНТОВ ИЗУЧЕННЫХ ГЕНОВ

В общей сложности было выявлено 80 нуклеотидных вариантов, не описанных ранее в международной базе данных HGMD (табл. 70), что составляет чуть менее половины (46,0%) от всех обнаруженных мутаций (рис. 105). Все выявленные нуклеотидные варианты были отфильтрованы по частоте минорного аллеля, не превышающей 0,01%, после чего подвергнуты биоинформатическому анализу, согласно российскому Руководству по интерпретации данных последовательности ДНК человека [51].

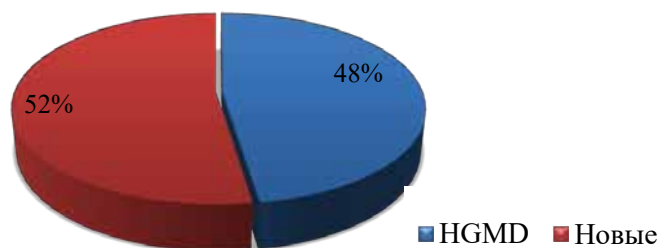


Рис. 105. Соотношение новых мутаций и мутаций, описанных ранее в базе HGMD, у детей с генетически обусловленными КМП

Таким образом, биоинформатический анализ данных не описанных ранее нуклеотидных вариантов показал, что 27 вариантов можно считать патогенными, 32 варианта – вероятно патогенными, 20 вариантов – с неизвестной патогенностью, при этом 67 (83,8%) из них являются синглтонами.

Такой высокий процент неописанных мутаций свидетельствует о высокой гетерогенности и слабой изученности генетических причин

развития КМП у российских детей. В широкомасштабных зарубежных исследованиях генетических причин развития КМП у детей также обращает на себя внимание высокий процент новых мутаций [570].

4.6.6. ВЫВОДЫ

В рамках этой работы впервые в России проведено столь масштабное исследование таргетных областей генома с целью выявления и описания этиологических причин развития генетически обусловленных КМП среди детского населения. Разработанный алгоритм диагностики этих гетерогенных болезней позволил провести исследование 199 детям с подозрением на генетически обусловленную КМП и обнаружить посредством методов СНП и ХММА этиологические причины развития КМП у 181 ребенка, выявив 173 нуклеотидных варианта в 39 изученных генах и протяженную делецию хромосомной области 1p36 и описав 80 новых 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. Благодаря анализу полученных данных впервые удалось описать частоты различных типов генетически обусловленных КМП среди российских детей, определить возрастные и географические особенности развития КМП. Выявленные генотип-фенотипические корреляции указывают на повышенный риск дебюта первичной КМП в возрасте до 3 месяцев у детей с наличием мутаций, преждевременно прерывающих синтез кодируемых белков, и мутаций, затрагивающих канонические сайты сплайсинга (ОШ=2,8 (ДИ 1,2–7,0)), а также у детей, обладающих рецессивными мутациями генов *MYBP3*, *MYL3* и *NEXN* (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 *MYBP3* (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. Изучая семейные и спорадические случаи КМП в нашем исследовании, мы смогли сравнить обе группы и обнаружить более высокую частоту мутаций в семейных случаях: 67,9% против 32,1%. В группе детей с КМП, вызванными мутациями, возникшими спорадически, существует высокодостоверная ассоциация ($p<0,001$) с беременностями, протекавшими с ОРВИ на ранних стадиях развития эмбриона, 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 физиологиче-

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

С очевидной эффективностью, совершенствуемой точностью и снижением себестоимости исследования, высокопроизводительное секвенирование постепенно становится стандартом секвенирования 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 значимость диагностики таргетных областей 75 генов генома человека, убеждаясь, что СНП с валидацией выявленных вариантов методом Сэнгера 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 [778] как основы молекулярной медицины ближайшего будущего [130], что также находит подтверждение в недавнем успешном применении технологии редактирования генома CRISPR-Cas9 у эмбриона, содержащего материнскую мутацию гена *MYBP3* [609].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования позволили оптимизировать существующие и разработать новые алгоритмы генетической диагностики наследственной патологии, определить относительные частоты и спектр мутаций, характерных для российских пациентов, а также выявить новые мутации и описать генотип-фенотипические корреляции.

С момента открытия структуры ДНК ученые всего мира старались расшифровать ее полную нуклеотидную последовательность, реализовав свои стремления в 2003 году посредством проекта «Геном человека». Стремительный прогресс, достигнутый в последние 15 лет в геномике за счет ранней диагностики и следующей за ней персонализированной терапии предсказывает, что в течение следующих десятилетий геномика превратит прикладную медицину из ретроспективной и интервенционной в перспективную и упреждающую. Автор твердо уверен в том, что в ближайшем будущем полногеномное секвенирование станет новым стандартом рутинной клинической геномики за счет снижения себестоимости и трудозатрат, а также за счет прочтения некодирующих областей и надежного обнаружения структурных элементов по сравнению с полноэкзомным секвенированием [588, 901]. Это особенно актуально для сложных гетерогенных болезней, клиническая картина развития которых не имеет выраженных особенностей, а значит, не позволяет клиническим генетикам заподозрить конкретную патологию. Однако чаще всего опытные клиницисты очерчивают определенный круг наследственных заболеваний со сходными фенотипическими проявлениями, а методы функциональной диагностики не способны сузить его до размеров одной-двух нозологических единиц. Пошаговое секвенирование нескольких генов-кандидатов в поисках патогенных вариантов отнимает много временных и материальных ресурсов и не всегда заканчивается успехом. Тогда как полноэкзомное секвенирование в большинстве случаев избыточно и материально неоправданно. Все это указывает на то, что оптимизация молекулярно-генетической диагностики таких болезней в настоящее время должна сводиться к одновременному прочтению значимых областей 20–400 генов, заключенных в одну диагностическую панель, посредством высокопроизводительного секвенирования. Именно такой подход можно считать максимально эффективным и экономически выгодным для диагностики таких групп заболеваний, как несовершенный остеогенез, стероидрези-

стентный нефротический синдром, гликогеновые болезни, кардиомиопатии и многие другие.

При этом для тех наследственных болезней, для которых разработаны скрининговые методы биохимической диагностики сниженной активности одних анализов и повышенной концентрации других, молекулярно-генетическую диагностику следует использовать точно, исключительно в качестве подтверждающего метода, начиная исследования с поиска мутаций, характерных для популяций, населяющих территорию современной России. Особенное значение имеет своевременное выявление наследственных заболеваний, имеющих патогенетическое лечение. Именно для таких состояний, как тирозинемия, тип I и болезнь Помпе, особенно важно диагностировать болезнь в первые дни жизни посредством неонатального скрининга при помощи разработанного метода тандемной масс-спектрометрии, позволяющего «просеивать» более 100 000 биологических образцов в год на одном масс-спектрометре в автоматическом режиме. Внедрение тандемной масс-спектрометрии для проведения массового скрининга новорожденных в нашей стране существенно расширит спектр выявляемых заболеваний, а внедрение молекулярно-генетической подтверждающей диагностики сведет к минимуму вероятность ошибки. В ходе проведения исследования разработаны и оптимизированы алгоритмы диагностики наиболее частых наследственных болезней, наблюдаемых в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России за время проведения исследования, продлившегося с 2014 по 2021 годы. В результате научной работы были описаны 1150 случаев редких болезней с мутациями в 82 генах из 178 изученных, определены мажорные мутации для 12 редких наследственных заболеваний, обнаружен и описан 321 новый вариант генома, что составляет чуть менее 7% всех аннотированных в базе HGMD мутаций в исследованных генах. Результаты данной работы также могут служить в качестве справочника для создания баз данных, которые, как ожидается, помогут в определении корреляций генотипа и фенотипа конкретного больного, персонифицируя намеченную терапию, определяя прогноз и упрощая проведение пренатальной и преимплантационной диагностики в целях профилактики наследственных болезней. Существует широкий спектр генетически обусловленных болезней [1, 4, 5, 6, 49, 65, 231], не вошедших в данную монографию, для которых в нашей стране также разработаны и оптимизированы методы генетической диагностики и описанию которых планируется посвятить будущие публикации.

В конечном счете, расширение нашего понимания генетической основы наследственных болезней является необходимым первым шагом к разработке репертуара новых терапевтических средств для

максимально точной персонализации лечения пациентов, включая низкомолекулярные средства, специфичные для определенных мутаций, а также технологии редактирования генома. Достижение всестороннего понимания функциональных последствий генетической изменчивости на биохимическом, клеточном, органном и организменном уровнях является фундаментальным научным знанием, намного превосходящим по сложности проект «Геном человека», в основании которого в настоящее время лежит генетическая диагностика.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ	– артериальная гипертензия
АГУС	– атипичный гемолитико-уремический синдром
АД	– аутосомно-доминантное наследование
АКМП	– аритмогенная кардиомиопатия
АЛТ (ALT)	– аланинаминотрансфераза, аланинтрансминаза
(ц)АМФ	– (циклический) аденозинмонофосфат
АО	– автономный округ
АПФ	– ангиотензинпревращающий фермент
АР	– аутосомно-рецессивный тип наследования
АСТ	– аспартатаминотрансфераза
АТФ (АТР)	– аденозинтрифосфат
БГ	– болезнь Гоше
БП	– болезнь Помпе
БФ	– болезнь Фабри
ВПС	– врожденные пороки сердца
ВЭЖХ-МС/ МС	– высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией
ГАГ	– гликозаминогликаны
ГБ	– гликогеновые болезни
Гб3 (Gb3)	– глоботриаозилцерамид
Гл1 (Gl1)	– гликозилфингозин
ГКМП	– гипертрофическая кардиомиопатия
ГЛЖ	– гипертрофия левого желудочка
ГУС	– гемолитико-уремический синдром
ДИ(CI)	– доверительный интервал (<i>от англ.</i> Confidence Interval)
ДКМП	– дилатационная кардиомиопатия
ДМС	– диффузный мезангиальный склероз
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ДТТ	– 1,4-дителиотрейтол
ЗМР	– задержка моторного развития
ЗПМР	– задержка психомоторного развития
ЗФР	– задержка физического развития
КМП	– кардиомиопатия
КФК	– креатинфосфокиназа
ЛБН	– лизосомные болезни накопления
ЛДГ (LDH)	– лактатдегидрогеназа



МГНЦ	– Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова, федеральное государственное бюджетное научное учреждение (ФГБНУ «МГНЦ»)
МЕЛАС (MELAS)	– митохондриальная энцефаломиопатия (от англ. Mitochondrial encephalomyopathy)
МН	– мембранная нефропатия
МПГН	– мембранопролиферативный гломерулонефрит
МПС	– мукополисахаридоз
МРТ	– магнитно-резонансная томография
МС/МС	– тандемная масс-спектрометрия
НБО	– наследственные болезни обмена
НКМП	– некомпактная кардиомиопатия
НМИЦ гематологии	– Национальный медицинский исследовательский центр гематологии, федеральное государственное бюджетное учреждение Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России)
НМИЦ здоровья детей	Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей, федеральное государственное автономное учреждение Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России)
НО	– несовершенный остеогенез
НРС	– нарушения ритма сердца
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
ПФ	– пиридоксальфосфат
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РКМП	– рестриктивная кардиомиопатия
РНК	– рибонуклеиновая кислота
СД	– сахарный диабет
СЗНС	– стероидзависимый нефротический синдром
СНГ	– содружество независимых государств
СНП (NGS)	– секвенирование нового поколения (от англ. Next Generation Sequencing)
СРНС	– стероидрезистентный нефротический синдром
СРТ	– субстрат-редуцирующая терапия
СЧНС	– стероидчувствительный нефротический синдром
ТТСК	– трансплантация гемопоэтических стволовых клеток

ТК	– трехстворчатый клапан
ТКМ	– трансплантация костного мозга
ТМС	– тандемная масс-спектрометрия
тХПН	– терминальная стадия хронической почечной недостаточности
УЗИ	– ультразвуковое исследование
ФЗТ	– ферментозаместительная терапия
ФСГС	– фокальный сегментарный гломерулосклероз
ХБП	– хроническая болезнь почек
ХММА	– хромосомный микроматричный анализ
ХПН	– хроническая почечная недостаточность
ЦНС	– центральная нервная система
ЩД	– щелевая диафрагма
ЭКГ	– электрокардиография
эхо-КГ	– эхокардиография
ACMG	– Американская коллегия медицинской генетики и геномики (от <i>англ.</i> The American College of Medical Genetics and Genomics)
CDC	– Центр по контролю и профилактике заболеваний (от <i>англ.</i> Centers for Disease Control and Prevention)
FDA	– Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (от <i>англ.</i> Food and Drug Administration)
FISH	– флуоресцентная гибридизация, или FISH-метод (от <i>англ.</i> Fluorescence in Situ Hybridization)
FWHM	– полная ширина на уровне половинной амплитуды (от <i>англ.</i> Full Width at Half Maximum)
GANC	– нейтральная α -глюкозидаза С
GMP	– стандарт надлежащей производственной практики (от <i>англ.</i> Good Manufacturing Practice)
GPD1	– глицерол-3-фосфатдегидрогеназа
HGMD	– база данных мутаций в генах человека, которые вызывают наследственные заболевания или связаны с ними (от <i>англ.</i> Human Gene Mutation Database)
MLPA	– мультиплексная лигазозависимая амплификация проб (от <i>англ.</i> Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification)
OMIM	– медицинская база данных «Менделевское наследование у человека» (от <i>англ.</i> Online Mendelian Inheritance in Man)
PDHc	– пируватдегидрогеназа
SUAC	– сукцинилацетон
VUS	– вариант с неизвестной патогенностью (от <i>англ.</i> Variant of Uncertain Significance)
PPP	– пентозофосфатный путь



ПРИЛОЖЕНИЕ А

Характеристика выборок и материала для исследований

В основу научной работы положены результаты исследований, проведенных в лаборатории молекулярной генетики и медицинской геномики Центра фундаментальных исследований в педиатрии Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации с 2014 по 2021 годы. Клинические, географические, возрастные и генетические характеристики российских пациентов были изучены при использовании выборки из 32 954 пациентов, диагностика которых осуществлялась в соответствии с разработанным нами алгоритмом, изображенным на рис.115.

32 447 из этих пациентов поступили в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» из региональных медико-генетических консультаций, родильных домов, больниц, многопрофильных медицинских и диализных центров и были обследованы в рамках селективного скрининга с подозрением на следующие редкие болезни: БФ, БП, БГ, МПС, тип I и II, тирозинемия, тип I, цистиноз, ГБ, НО, НС и КМП. Кроме того, в работе исследовался биоматериал 401 пациента с НБО, лабораторный диагноз которым был поставлен вне рамок проведения селективного скрининга, а также биоматериал 106 пациентов с подозрением на семейные случаи БФ, которым, как и 401 пациенту с НБО, было проведено молекулярно-генетическое исследование методом секвенирования по Сэнгеру в нашей лаборатории. Дополнительно необходимо отметить, что анализ ферментативной активности идуронат-2-сульфатазы 1082 пациентов проводился в лаборатории иммунологии и вирусологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

Критериями отбора пациентов для селективного скрининга БФ являлись акропарестезии, гипогидроз, ангиокератомы, поражение почек, вплоть до тяжелой почечной недостаточности, ранние инсульты. Критериями отбора БП для ранней формы являлись выраженная диффузная мышечная гипотония, миопатия, кардиомегалия, кардиомиопатия, макроглоссия, нарушения ритма сердца; при взрослых формах – диффузная мышечная гипотония, мышечная слабость, приемы миопата при вставании, ходьбе, увеличение КФК. Критериями отбора БГ являлись гепатоспленомегалия, анемия, тромбоцитопения, а также наличие

клеток Гоше в биоптате костного мозга. Критериями отбора пациентов с мукополисахаридозами были пупочные грыжи, пахово-мошоночные грыжи, шумное дыхание, частые ОРВИ, отиты, бронхиты, изменение лица по типу гарголизма, изменение скелета по типу множественного дизостоза, контрактуры крупных и мелких суставов, поражения клапанов сердца, гепатоспленомегалия. Критериями отбора пациентов с тирозинемией были иктеричность склер, кожи, гепатомегалия, нарушение функции печени вплоть до цирроза, рахитические изменения скелета. В биохимическом анализе: увеличение билирубина, печёночных трансаминаз, лактатдегидрогеназы, гипокоагуляция, гипогликемия. Для селективного скрининга на цистиноз критериями отбора пациентов являлись задержка физического развития, деформации скелета, рвота, дегидратация, полиурия, метаболический ацидоз, синдром Фанкони и фотофобия.

Молекулярно-генетическая диагностика НО методом высокопроизводительного секвенирования была разработана для обследования 70 пациентов из отделения диагностики и восстановительного лечения детей с заболеваниями опорно-двигательного аппарата, а также отделения нефроурологических, метаболических болезней и заместительной почечной терапии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России. Критериями отбора являлись деформации конечностей, особенности фенотипа, нарушение минерализации костей черепа, частые переломы, голубые склеры, янтарные зубы.

Молекулярно-генетическая диагностика ГБ была разработана для обследования 109 пациентов отделений гастроэнтерологии, психоневрологии и психосоматической патологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России с подозрением на ГБ. Критериями отбора являлись кукольное лицо, гепатомегалия, нарушение функции печени, вплоть до развития цирроза, задержка физического развития. В биохимическом анализе – гипогликемия, гиперурикемия, увеличение печёночных трансаминаз, лактатцидоз, нейтропения.

Молекулярно-генетическая диагностика НС была разработана для обследования 176 пациентов отделения нефрологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России. Для изучения генетических причин НС у российских детей нами были применены следующие критерии отбора: отсутствие ответа на кортикостероидную терапию в течение 4 недель с момента начала терапии; врожденный, инфантильный или ювенильный СРНС; гистологическая картина ФСГС, ДМС, НСМИ или МПГН, полученная в ходе биопсии почек; наличие внепочечных проявлений (синдромы); ХБП, 1-5 стадии, тХПН.

Молекулярно-генетическая диагностика наследственных КМП была разработана при обследовании 199 пациентов отделения карди-

ологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России. Критерием отбора являлась кардиомиопатия (ГКМП, ДКМП, РКМП, АКМППЖ, некомпактный миокард левого желудочка) с фенотипическими особенностями или без них.

Букальный эпителий исследовался у 106 пациентов с подозрением на семейные случаи БФ, для описания остальных случаев использовалась кровь.



ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Измерение активности лизосомных ферментов

Измерение активности ферментов α -галактозидазы А, α -1,4-глюкозидазы, β -D-глюкоцереброзидазы и α -L-идурунидазы проводилось на тандемном масс-спектрометре BrukerMaxis Impact (Германия) с положительной ионизацией в электроспрее методом МС/МС. В качестве биологического материала использовали пятна крови, высушенные на фильтровальной бумаге. Контрольные образцы хранились согласно рекомендациям, предложенным DeJesus и соавторами [280]. Пробоподготовка проводилась с использованием субстратов и внутренних стандартов производства компании CDC (США), согласно протоколу, рекомендованному компанией производителя. В качестве элюента использовалась смесь ацетонитрила и воды с добавлением муравьиной кислоты. Детекция ионов проводилась с помощью проточно-инжекционного анализа с использованием метода MRM-мониторинга. Масс-анализатор работал в режиме детектирования ионов в диапазоне 100–550 m/z с точностью определения масс не ниже 5 ppm и разрешении не менее 20 000 (FWHM). Время анализа одной пробы составляло 3 минуты. Полученные данные обрабатывались с использованием встроенного пакета программ Bruker Data Analysis 4.1. В случае снижения активности анализируемого фермента проводили измерение активности другого лизосомного фермента в качестве контрольного. В случае снижения активности контрольного фермента анализ проводили на новом образце.

Для определения референсных значений активность ферментов α -галактозидазы А, α -1,4-глюкозидазы, β -D-глюкоцереброзидазы, и α -L-идурунидазы была измерена у 200 здоровых доноров. Мужская группа составила 100 человек (50%) в возрасте от 1 года до 60 лет. Средний возраст группы составил 30 лет. Женская группа составила 100 человек (50%), возраст варьировал от 1 года до 58 лет, средний возраст составил 27 лет.

В качестве внутреннего положительного контроля для диагностики БФ активность α -галактозидазы А в сухих пятнах крови была определена у 10 пациентов с низкой активностью фермента, измеренной флуориметрически в лаборатории иммунологии и вирусологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, до начала ФЗТ, а также у 11 пациентов, обнаруженных нами методом секвенирования

по Сэнгеру. Общее число пациентов с БФ составило 21 (17 мужчин и 4 женщины).

В группе здоровых мужчин диапазон значений α -галактозидазы А составил 2,38–31,02 мкмоль/л/ч, медиана 4,81 мкмоль/л/ч, тогда как в группе здоровых женщин диапазон значений α -галактозидазы А значимо не отличался и составлял 2,19–22,20 мкмоль/л/ч, медиана 3,80 мкмоль/л/ч.

В группе больных мужчин диапазон значений α -галактозидазы А составлял 0,02–1,51 мкмоль/л/ч, медиана 0,64 мкмоль/л/ч, тогда как в группе женщин этот диапазон составил 0,48–4,12 мкмоль/л/ч, медиана 2,48 мкмоль/л/ч.

Диапазоны значений активности α -галактозидазы А в пятнах высушенной крови с минимальными, максимальными значениями, медианой и интерквартильным размахом в контрольной группе, а также группах мужчин и женщин с мутациями гена *GLA*, представлены в виде коробчатых графиков (рис. 106).

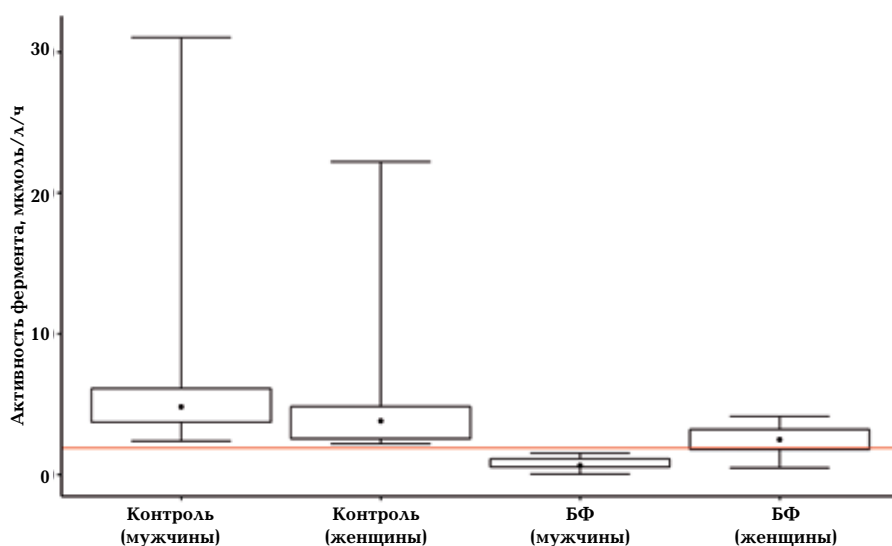


Рис. 106. Коробчатые графики показателей активности α -галактозидазы А в пятнах крови, высушенной на фильтровальной бумаге, в контрольных группах мужчин и женщин, мужчин с БФ и женщин с гетерозиготными мутациями, вызывающими БФ

Как показано на рис. 106, интервал активности α -галактозидазы А у больных мужчин лежал ниже и не перекрывался с интервалом активности α -галактозидазы А мужской группы контроля, тогда как у женщин с БФ наблюдалось перекрытие интервала активностей

α -галактозидазы А с соответствующим интервалом этого же фермента в женской группе контроля. Таким образом, определение активности α -галактозидазы А у женщин нельзя считать надежным методом диагностики БФ, что также подтверждается и литературными данными [15, 653, 1025]. Оптимальная отрезная точка для определения активности α -галактозидазы А составила 1,89 мкмоль/л/ч, что соответствует зарубежным данным [850].

В качестве внутреннего положительного контроля для диагностики БГ активность бета-D-глюкоцереброзидазы в пятнах крови измерена у 22 пациентов с БГ (8 пациентов мужского пола, 14 – женского), не получающих ФЗТ, которые были отправлены в нашу лабораторию для молекулярно-генетического подтверждения диагноза.

В группе здоровых доноров диапазон значений бета-D-глюкоцереброзидазы составил 2,34–46,78 мкмоль/л/ч, медиана 8,80 мкмоль/л/ч, тогда как в группе пациентов с БГ диапазон значений активности бета-D-глюкоцереброзидазы составил 0,22–1,48 мкмоль/л/ч, медиана 0,76 мкмоль/л/ч.

Диапазоны значений активности бета-D-глюкоцереброзидазы в пятнах высушенной крови с минимальными, максимальными значениями, медианой и интерквартильным размахом в контрольной группе и группе пациентов с диагнозом БГ представлены в виде коробчатых графиков (рис. 107).

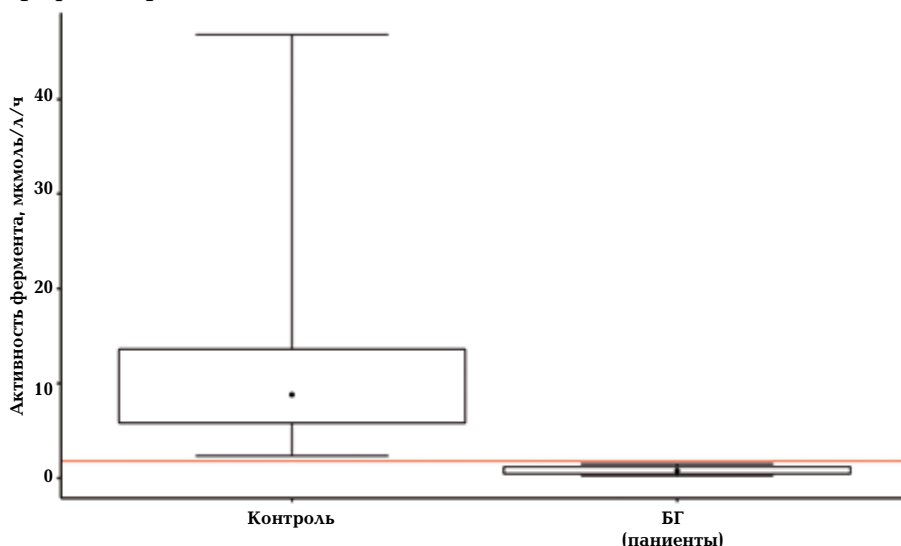


Рис. 107. Коробчатые графики показателей активности бета-D-глюкоцереброзидазы в пятнах крови, высушенной на фильтровальной бумаге, в группе контроля и группе пациентов с БГ

Как представлено на рис. 107, интервал активности бета-D-глюкоцереброзидазы у пациентов с БГ лежит ниже и не перекрывается с интервалом активности бета-D-глюкоцереброзидазы группы контроля. Оптимальная отрезная точка для активности бета-D-глюкоцереброзидазы составила 1,85 мкмоль/л/ч (см. рис. 107), что соответствует зарубежным данным [311].

В качестве внутреннего положительного контроля для диагностики БП активность α -1,4-глюкозидазы в сухих пятнах крови была измерена у пяти пациентов (3 женщины и 2 мужчины) со сниженной ферментативной активностью, не получающих ФЗТ, которые были отправлены в нашу лабораторию для молекулярно-генетического подтверждения диагноза.

В группе здоровых доноров диапазон значений α -1,4-глюкозидазы составил 2,89–50,96 мкмоль/л/ч, медиана 8,64 мкмоль/л/ч, тогда как в группе пациентов с БП диапазон значений активности α -1,4-глюкозидазы составил 0,24–1,78 мкмоль/л/ч, медиана 0,68 мкмоль/л/ч.

Диапазоны значений активности α -1,4-глюкозидазы в пятнах высушенной крови с минимальными и максимальными значениями, медианой и интерквартильном размахом в контрольной группе и группе пациентов с диагнозом БП представлены в виде коробчатых графиков (рис. 108).

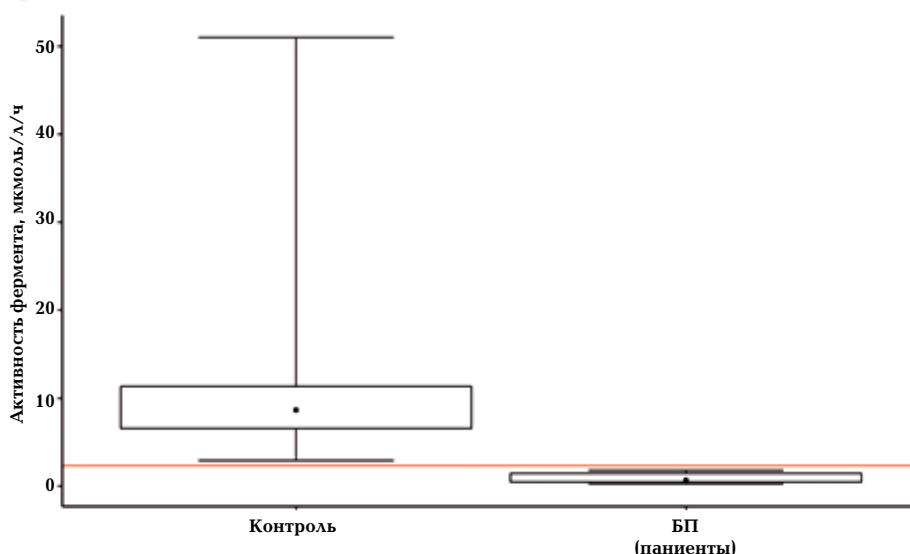


Рис. 108. Коробчатые графики показателей активности α -1,4-глюкозидазы в пятнах крови, высушенной на фильтровальной бумаге в группе контроля и группе пациентов с БП

При этом, как видно из рис. 108, до проведения селективного скрининга интервал активности α -1,4-глюкозидазы у всех пяти больных лежал ниже и не перекрывался с интервалом активности α -1,4-глюкозидазы в группе контроля. Значение отрезной точки для активности α -1,4-глюкозидазы, равное 2,30 мкмоль/л/ч, было выбрано на основе значения отрезной точки в работах зарубежных авторов [160, 850], с учетом полученных нами референсных значений активности α -1,4-глюкозидазы, а также значений активности этого фермента в группе пациентов с БП.

В качестве внутреннего положительного контроля для диагностики МПС, тип I активность α -L-идуронидазы в пятнах крови была измерена у 8 пациентов (4 девочки и 4 мальчика) с МПС, тип I, не получающих ФЗТ.

В группе здоровых доноров диапазон значений активности α -L-идуронидазы составил 2,72–30,57 мкмоль/л/ч, медиана 8,39 мкмоль/л/ч, тогда как в группе пациентов с МПС, тип I диапазон значений активности α -L-идуронидазы составил 0,17–1,45 мкмоль/л/ч, медиана 0,78 мкмоль/л/ч.

Диапазоны значений активности α -L-идуронидазы в пятнах высушенной крови с минимальными и максимальными значениями, медианой и межквартильным интервалом в контрольной группе, а также в группе больных пациентов представлены в виде коробчатых графиков (рис. 109).

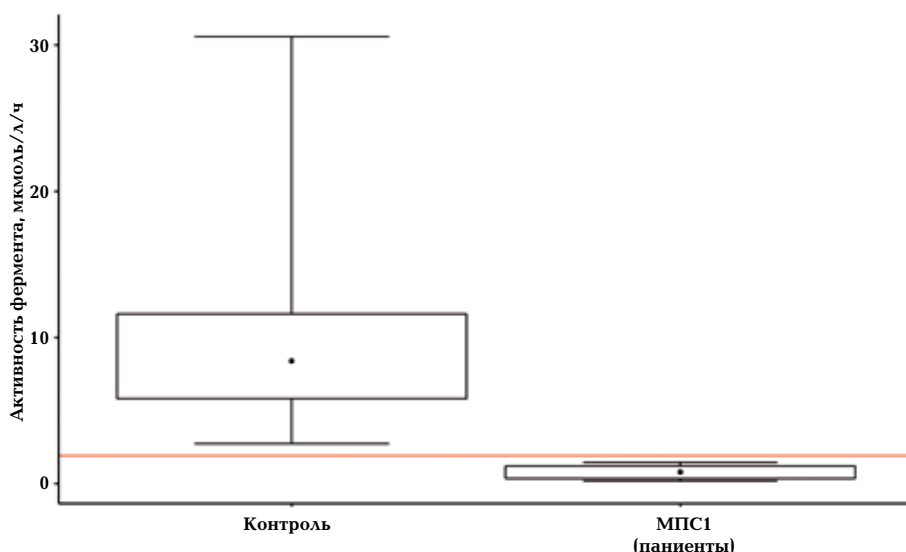


Рис. 109. Коробчатые графики показателей активности α -L-идуронидазы в пятнах крови, высушенной на фильтровальной бумаге, в группе контроля и группе пациентов с МПС, тип I

Как представлено на рис. 109, интервал значений активности α -L-идуронидазы у больных детей лежит ниже и не перекрывается с интервалом значений активности α -L-идуронидазы пациентов из группы контроля. Значение отрезной точки для активности α -L-идуронидазы, составляющее 1,89 мкмоль/л/ч, было выбрано на основе значения отрезной точки в работах зарубежных авторов [328, 715] с учетом полученных нами референсных значений активности α -L-идуронидазы, а также значений активности этого фермента в группе пациентов с МПС, тип I.

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Измерение концентрации тирозина и сукцинилацетона

Измерение концентрации сукцинилацетона, а также спектра аминокислот и ацилкарнитинов проводилось на тандемном масс-спектрометре Bruker Maxis Impact (Германия) с положительной ионизацией в электроспрее методом МС-МС. В качестве биологического материала использовали пятна крови, высушенные на фильтровальной бумаге. Пробоподготовка проводилась с использованием набора реактивов для тандемной масс-спектрометрии NeoBase™ производства компании Wallac Oy (Финляндия) согласно инструкции компании производителя [687]. Детекция ионов проводилась с помощью проточно-инжекционного анализа с использованием метода MRM-мониторинга. Аналитические характеристики набора были определены компанией-производителем. Масс-анализатор работал в режиме детектирования ионов в диапазоне 50–550 m/z с точностью определения масс не ниже 5 ppm и разрешении не менее 20 000 (FWHM). Время анализа одной пробы составляло 3 минуты. Полученные данные обрабатывались с использованием встроенного пакета программ Bruker Data Analysis 4.1.

Для определения референсных значений концентрация сукцинилацетона была измерена в контрольной группе из 100 здоровых доноров. Мужская группа составила 50 человек (50%) в возрасте от 3 месяцев до 15 лет, средний возраст группы составил 8,5 лет. Женская группа составила 50 человек (50%), возраст варьировал от 2 месяцев до 14 лет, средний возраст составил 7 лет. В качестве внутреннего положительного контроля концентрация сукцинилацетона в пятнах крови была измерена у 2 пациентов (девочки и мальчика) с высокими значениями концентрации сукцинилацетона в моче и верифицированными с помощью молекулярно-генетических методов до начала терапии.

В группе здоровых доноров диапазон значений концентрации сукцинилацетона составил 0,24–1,78 мкмоль/л, медиана 0,82 мкмоль/л, тогда как в группе пациентов с тирозинемией, тип I диапазон значений концентрации сукцинилацетона составил 2,60–8,90 мкмоль/л, медиана 5,75 мкмоль/л.

Диапазоны значений концентрации сукцинилацетона в пятнах высушенной крови с минимальными и максимальными значениями, медианой и межквартильным интервалом в контрольной группе,

а также в группе больных пациентов с тирозинемией, тип I представлены в виде коробчатых графиков (рис. 110).

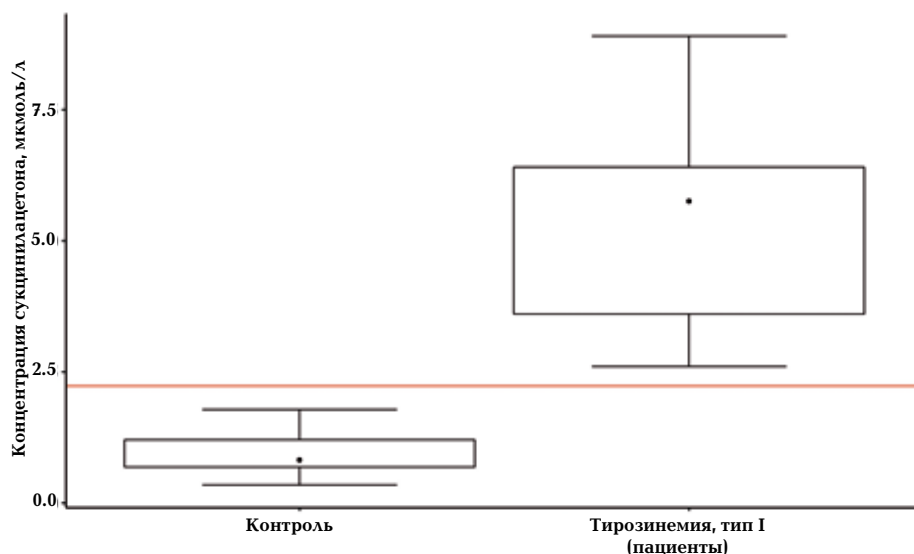


Рис. 110. Коробчатые графики показателей концентрации сукцинилацетона в пятнах крови, высушенной на фильтровальной бумаге, в группе контроля и группе пациентов с тирозинемией, тип I

Как представлено на графике (рис. 110), диапазон значений концентрации сукцинилацетона у пациентов с тирозинемией, тип I лежит выше и не перекрывается со значениями концентраций сукцинилацетона в группе контроля. Значение отрезной точки для концентрации сукцинилацетона, равное 2,23 мкмоль/л, было выбрано на основе значения отрезной точки в работах зарубежных авторов [291, 554, 664], с учетом полученных нами референсных значений концентрации сукцинилацетона, а также значений концентрации сукцинилацетона в группе пациентов с тирозинемией, тип I.

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Измерение концентрации ЦИСТИНА

Измерение концентрации цистина проводилось на тандемном масс-спектрометре Bruker Maxis Impact (Германия). В качестве биологического материала использовали цельную кровь, из которой получали лейкоциты градиентным методом с использованием раствора Фиколла (Amresco, США). Хроматографическое разделение проводилось на хроматографе Agilent 1260 (США) с использованием колонки SIELC Primesep 200 (США). В качестве элюента была использована смесь ацетонитрила и воды с добавлением муравьиной кислоты. Масс-спектрометрическое детектирование проводилось в режиме регистрации положительных ионов с использованием электрораспылительной ионизации. Масс-анализатор работал в режиме детектирования ионов в диапазоне 100–500 m/z с точностью определения масс не ниже 5 ppm и разрешении не менее 20 000 (FWHM). Аналитическая система была откалибрована в диапазоне концентраций цистина 0,11–11,10 мкмоль/л. Время анализа одной пробы составляло 15 мин. Полученные данные обрабатывались с использованием встроеного пакета программ Bruker Data Analysis 4.1.

Для определения референсных значений концентрация цистина в лейкоцитах крови была измерена в той же контрольной группе, что и концентрация сукцинилациетона. В качестве внутреннего контроля концентрация цистина была измерена у 7 пациентов (3 девочек и 4 мальчиков) с мутациями гена *CTNS*. При этом на момент проведения биохимической диагностики диагноз этим пациентам был поставлен на основании выраженных клинических проявлений и проведенного молекулярно-генетического исследования. Пациенты не получали терапию препаратом цистагон. У двух детей из этих семи были выявлены значения концентрации цистина 0,15 нмоль $\frac{1}{2}$ цистина/мг белка и 0,28 нмоль $\frac{1}{2}$ цистина/мг белка (границы референсных значений составили 0,11–0,30 нмоль $\frac{1}{2}$ цистина/мг белка, отрезная точка 1 нмоль $\frac{1}{2}$ цистина/мг белка), при этом в их геномах были обнаружены нуклеотидные варианты, описанные в базе данных HGMD как патогенные, что позволило считать значения цистина в этих двух случаях ложноотрицательными. Проведенный эксперимент показал, что причиной полученных ложноотрицательных значений явилось снижение концентрации цистина в анали-

зируемой фракции, что могло произойти за счет распада молекулы цистина в отсутствие стабилизатора [387]. Измерение концентрации цистина в лейкоцитах было проведено во время этапа лизиса клеток соникацией с различными интервалами времени инкубации при комнатной температуре, в результате чего удалось установить, что за 20 минут инкубации концентрация аналита падает более чем на 50%, тогда как при 60-минутной инкубации концентрация аналита близка к нулевым значениям.

Метод диагностики был оптимизирован следующим образом. Определение концентрации цистина проводили во фракции полиморфонуклеарных лейкоцитов, которые получали двойным градиентным методом с использованием HISTOPAQUE-1077 и HISTOPAQUE-1119 производства компании SIGMA (Германия). Во избежание распада цистина производили стабилизацию осадка клеток раствором N-этилмалеимида производства компании SIGMA (Германия), согласно модифицированному протоколу, описанному ранее [387]. Измерение концентрации цистина по измененной методике было повторно выполнено у всех 7 контрольных образцов в трех повторах с увеличением времени лизиса анализируемой фракции при комнатной температуре от 20 до 60 минут. У всех 7 образцов, в том числе и двух, показавших на ранее используемой методике ложноотрицательные результаты, были получены значения концентрации цистина выше отрезной точки даже при инкубации 60 минут.

В группе здоровых доноров диапазон значений концентрации цистина составил 0,11–0,45 нмоль $\frac{1}{2}$ цистина/мг белка, медиана 0,30 нмоль $\frac{1}{2}$ цистина/мг белка, тогда как в группе пациентов с цистинозом диапазон значений концентрации цистина теперь составлял 2,60–8,90 нмоль $\frac{1}{2}$ цистина/мг белка, медиана 4,60 нмоль $\frac{1}{2}$ цистина/мг белка.

Диапазоны значений концентрации цистина в полиморфонуклеарных лейкоцитах крови с минимальными и максимальными значениями, медианой и межквартильным интервалом в контрольной группе, а также в группе больных пациентов до и после проведения оптимизации методики представлены в виде коробчатых графиков (рис. 111, 112).

Как представлено на графике (см. рис. 112), после оптимизации методики диапазон значений концентрации цистина у всех пациентов с цистинозом лежит выше и не перекрывается со значениями концентраций цистина в группе контроля. Значение отрезной точки, равное 1,00 нмоль $\frac{1}{2}$ цистина/мг белка, для диагностики и мониторинга патогенетической терапии цистиноза было выбрано на основе значений отрезных точек в работах зарубежных авторов [378],

с учетом полученных нами референсных значений концентрации цистина, а также значений концентрации цистина в группе пациентов с цистинозом.

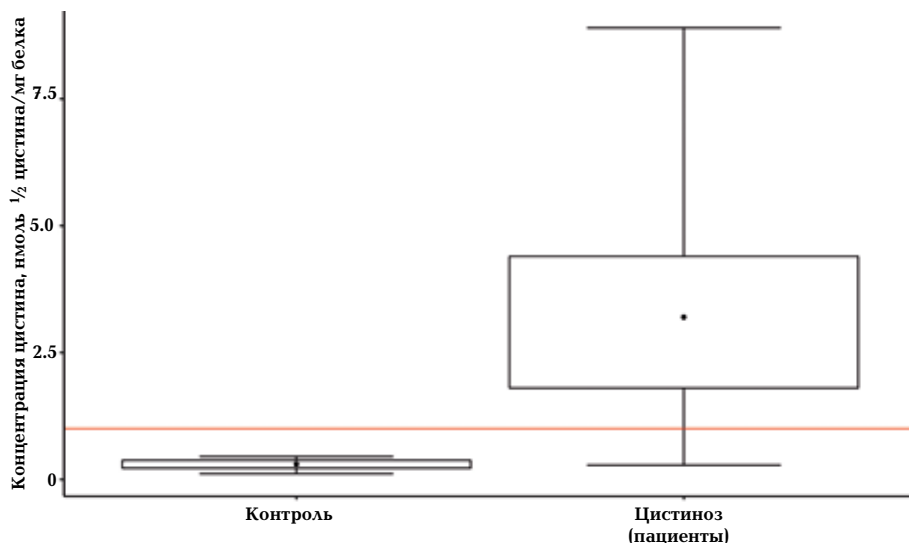


Рис. 111. Коробчатые графики показателей концентрации цистина в полиморфонуклеарных лейкоцитах крови в группе здоровых и группе больных цистинозом до оптимизации методики

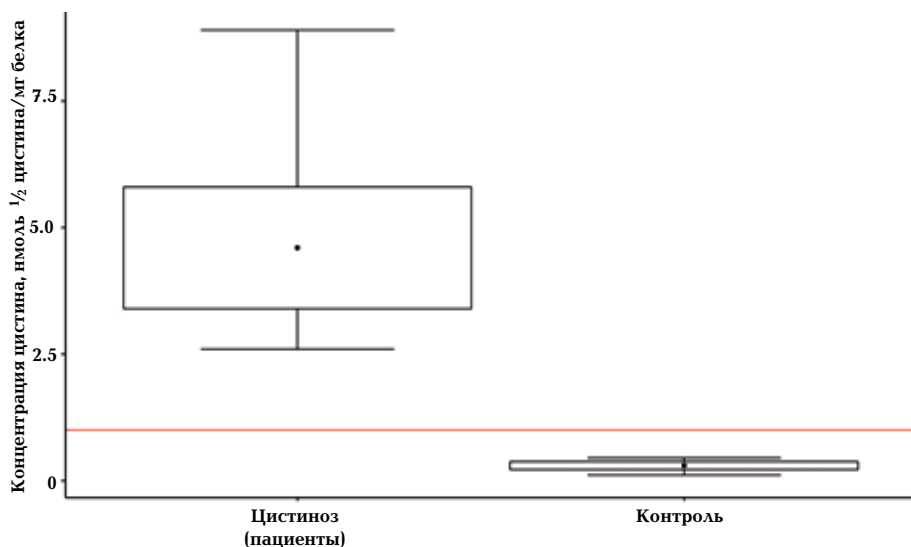


Рис. 112. Коробчатые графики показателей концентрации цистина в полиморфонуклеарных лейкоцитах крови в группе здоровых и группе больных цистинозом после оптимизации методики

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Измерение концентрации глоботриаозилсфингозина

Измерение концентрации лизо-Гб3 проводилось на тандемном масс-спектрометре Bruker Maxis Impact (Германия) с положительной ионизацией в электроспрее методом ВЭЖХ-МС/МС. В качестве биологического материала использовали пятна крови, высушенные на фильтровальной бумаге. Пробоподготовка проводилась с использованием лизо-церамидтригексозида производства компании Matreya (США) в качестве внутреннего стандарта. Хроматографическое разделение проводилось на хроматографе Agilent 1260 (США) с использованием колонки YMC-Triart C18, 2.0×50 (Япония). В качестве элюента была использована смесь ацетонитрила и воды с добавкой муравьиной кислоты. Масс-спектрометрическое детектирование проводилось в режиме регистрации положительных ионов с использованием электрораспылительной ионизации. Аналитическая система была откалибрована в диапазоне концентраций глоботриаозилсфингозина 1,0–50,0 нг/мл. Масс-анализатор работал в режиме детектирования ионов в диапазоне 100–800 m/z с точностью определения масс не ниже 5 ppm и разрешении от 40 000 до 60 000 (FWHM). Время анализа одной пробы составляло 13 минут. Полученные данные обрабатывались с использованием встроенного пакета программ Bruker Data Analysis 4.1.

Для определения референсных значений концентрация лизо-Гб3 была измерена в той же группе из 200 здоровых доноров, которая была использована ранее для определения референсных интервалов активности ферментов α -галактозидазы А, α -1,4-глюкозидазы, β -D-глюкоцереброзидазы и α -L-идуронидазы. В качестве внутреннего положительного контроля концентрация лизо-Гб3 в сухих пятнах крови была измерена у пациентов с низкой активностью фермента α -галактозидазы А, измеренной до начала ФЗТ и подтвержденной методом секвенирования по Сэнгеру. Общее число пациентов группы составило 21 человек (17 мужчин и 4 женщин).

В группе здоровых мужчин диапазон значений концентрации лизо-Гб3 составил 0,08–1,80 нг/мл, медиана 0,46 нг/мл, тогда как в группе здоровых женщин диапазон значений концентрации лизо-Гб3 значимо не отличался и составлял 0,12–1,66 нг/мл, медиана 0,48 нг/мл.



В группе больных мужчин диапазон значений концентрации лизо-Гб3 составил 7,0–65,0 мкмоль/л/ч, медиана 31,80 мкмоль/л/ч, тогда как в группе женщин с БФ этот диапазон составил 1,25–10,40 мкмоль/л/ч, медиана 2,93 мкмоль/л/ч.

Диапазоны значений концентрации лизо-Гб3 в пятнах высушенной крови с минимальными, максимальными значениями, медианой и интерквартильным размахом в контрольной группе и группе пациентов с диагнозом БФ представлены в виде коробчатых графиков (рис. 113).

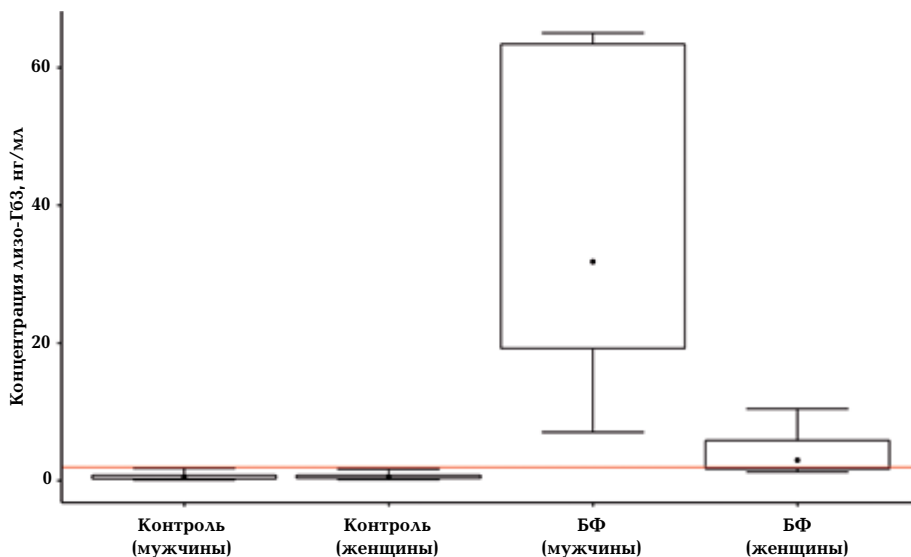


Рис. 113. Коробчатые графики показателей концентрации глоботриаозилсфингозина в пятнах крови, высушенной на фильтровальной бумаге, в группах контроля и у пациентов с БФ

Как представлено на рис. 113, диапазон значений концентрации лизо-Гб3 у мужчин с БФ лежит выше и не перекрывается со значениями концентраций лизо-Гб3 группы контроля. Оптимальная отрезная точка для концентрации лизо-Гб3 составила 1,91 нг/мл, что согласуется с данными зарубежных исследователей [640].

ПРИЛОЖЕНИЕ E

Измерение концентрации гликозилсфингозина

Измерения концентрации гликозилсфингозина (лизо-Гл1) в сухих пятнах крови проводились на тандемном масс-спектрометре Bruker Maxis Impact (Германия) с положительной ионизацией в электроспрее методом ВЭЖХ-МС/МС. Концентрацию гликозилсфингозина в анализируемом образце определяли как суммарную концентрацию гексозилсфингозинов. В качестве биологического материала использовали пятна крови, высушенные на фильтровальной бумаге. Пробоподготовка проводилась с использованием диметилпсихозина производства компании Avanti® Polar Lipids (США) в качестве внутреннего стандарта. Хроматографическое разделение проводилось на хроматографе Agilent 1260 (США) с использованием колонки YMC-Triart C18, 50 × 2.0 (Япония). В качестве элюента была использована смесь ацетонитрила и воды с добавлением муравьиной кислоты, элюирование проводили в градиентном режиме. Аналитическая система была откалибрована в диапазоне концентраций 1,0–50,0 нг/мл. Масс-спектрометрическое детектирование проводилось в режиме регистрации положительных ионов с использованием электрораспылительной ионизации. Масс-анализатор работал в режиме детектирования ионов в диапазоне 100–800 m/z с точностью определения масс не ниже 5 ppm и разрешением не менее 20 000 (FWHM). Время анализа одной пробы составляло 15 минут. Полученные данные обрабатывались с использованием встроенного пакета программ Bruker Data Analysis 4.1.

Для определения референсных значений концентрация лизо-Гл1 была измерена в той же группе из 200 здоровых доноров, которая была использована ранее для определения референсных интервалов активности ферментов α -галактозидазы А, α -1,4-глюкозидазы, β -D-глюкоцереброзидазы и α -L-идуронидазы.

В качестве внутреннего положительного контроля для диагностики БГ концентрация лизо-Гл1 в пятнах крови измерена у 22 пациентов с БГ (8 пациентов мужского пола, 14 – женского), не получающих ФЗТ, которые были отправлены в нашу лабораторию для молекулярно-генетического подтверждения диагноза.

В группе здоровых доноров диапазон значений концентрации лизо-Гл1 составил 0,24–8,40 нг/мл, медиана 2,21 нг/мл, тогда как

в группе больных диапазон значений концентрации лизо-Гл1 составлял 54,0–868,40 нг/мл, медиана 230,40 нг/мл.

Диапазоны значений концентрации лизо-Гл1 в пятнах высушенной крови с минимальными, максимальными значениями, медианой и интерквартильным размахом в контрольной группе и группе пациентов с диагнозом БГ представлены в виде коробчатых графиков (рис. 114).

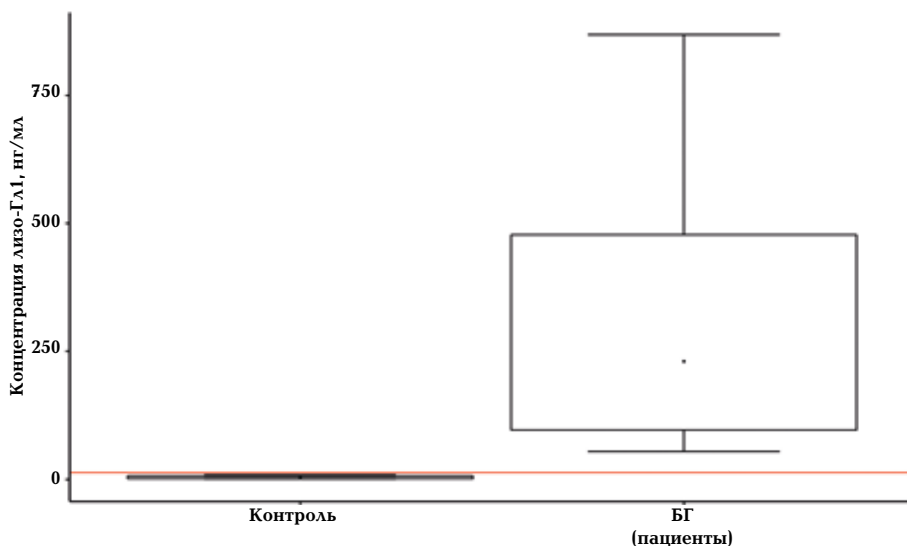


Рис. 114. Коробчатые графики показателей концентрации гликозилсингозина в пятнах крови, высушенной на фильтровальной бумаге, в группе контроля и у пациентов с БГ

Как представлено на рис. 114, диапазон значений концентрации лизо-Гл1 у пациентов с БГ лежит выше и не перекрывается со значениями концентраций лизо-Гл1 группы контроля. Оптимальная отрезная точка для концентрации лизо-Гл1 составила 12,78 нг/мл, что согласуется с данными зарубежных исследователей [806].

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

Выделение геномной ДНК

Выделение геномной ДНК осуществлялось с помощью набора реактивов DNA Blood Mini Kit, производства компании QIAGEN (Германия), на автоматической станции QIAQUBE, производства компании QIAGEN (Германия), согласно протоколу, рекомендованному производителем [781]. В качестве биологического материала использовали пятна крови, высушенные на фильтровальной бумаге (карта-фильтр № 903), и цельную кровь. Элюция ДНК осуществлялась в 100–200 мкл Low TE буфера, производства компании QIAGEN (Германия). Качество и количество ДНК оценивали при помощи спектрофотометра NanoVue (GE Healthcare, Швеция), а также флуориметра нового поколения Qubit 3.0 (Invitrogen, США). В случае выделения ДНК из клеток буккального эпителия и биоптата ворсин хориона или амниотической жидкости использовался метод фенол-хлороформной экстракции согласно методике, рекомендованной Green и соавторами [400].

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Подбор и синтез олигонуклеотидов

Все олигонуклеотиды, необходимые для проведения молекулярно-генетических исследований, подбирались при помощи компьютерной программы BeaconDesigner 8.10 производства компании PREMIER Biosoft International (США). Проверка специфичности пар праймеров проводилась с помощью программы Primer-BLAST [777]. Синтез олигонуклеотидов осуществлялся компанией ЗАО «Евроген» (Россия) фосфорамидитным методом на автоматических синтезаторах ДНК производства компании Applied Biosystems (США).



ПРИЛОЖЕНИЕ И

Полимеразная цепная реакция

Аmplification проводили на термоциклерах Bio-Rad T100 (Bio-Rad, США) и ProFlex (ThermoFisher Scientific, США) в 10–20 мкл реакционной смеси AmplitaqGold 360 (ThermoFisher Scientific, США), содержащей 500 нмоль праймеров и 20–50 нг геномной ДНК. Условия ПЦР: 95 °C / 2 мин – 1 цикл; 94 °C / 10 с, 54–66 °C / 30 с, 72 °C / 15 с – 34–40 циклов; 72 °C / 40 с – 1 цикл. Идентификацию продуктов реакции проводили в 1–2%-номагарозном геле, приготовленном из агарозы Amresco (США).

Для детекции протяженной делеции, длиной 57 т.п.н., в гене *CTNS* применялся метод мультиплексной ПЦР, предложенный Forestier и коллегами [340], с использованием трех специфичных пар праймеров. Гомозиготность делеции определяли с помощью амплификации фрагмента, содержащего STR маркер *D17S829* с использованием олигонуклеотидов *D17S829-forward*, CTAGGGGAGCGTGTTAGCAT и *D17S829_reverse*, TGTAAGACTGAGGCTGGAGC.

Для поиска рекомбинаций между геном *IDS* и псевдогеном *IDS2* методом ПЦР-ПДРФ с помощью рестриктаз *SacI* и *HinfI* использовали протокол, описанный Lualdy и коллегами [603].

ПРИЛОЖЕНИЕ К

Секвенирование методом Сэнгера

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 [931]. Амплификацию проводили на термоциклерах Bio-Rad T100 (Bio-Rad, США) и ProFlex (Thermo Fisher Scientific, США) в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 300 нмоль смеси праймера M13 (M13-forward, GTAAAACGACGGCCAGT или M13-reverse, CAGGAAACAGCTATGAC). Условия ПЦР: 98 °С / 3 мин – 1 цикл; 98 °С / 10 с, 50 °С / 10 с, 60 °С / 4 мин – 27 циклов. Капиллярный электрофорез осуществляли на автоматических секвенаторах ДНК ABI 3500XL и ABI 3500 (Thermo Fisher Scientific, США). Полученные последовательности сравнивались с референсными последовательностями RefSeqGene из базы данных Национального центра биотехнологической информации [707].



ПРИЛОЖЕНИЕ Л

Высокопроизводительное секвенирование

На первом этапе 1 мкг геномной ДНК фрагментировали ультразвуком до размера 200–300 п.н. с помощью соникатора Bioruptor® Picosonation system (Diadenode, Бельгия) согласно протоколу, рекомендованному производителем [292]. Затем проводился этап «тупления концов –end reparing» с использованием набора KAPA Library preparation Kit (Roche, Германия), в результате чего за счет ферментативной реакции у всех полученных геномных фрагментов были модифицированы 5'- и 3'-концы. Фрагменты длиной 200–300 п.н. были затем дважды очищены 0,5-кратным и 2-кратным объемами магнитных частиц Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, США). Количество ДНК измеряли на флуориметре Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific, США). Определение размеров фрагментов ДНК выполняли с помощью Agilent HS Bioanalyzer Chip (Agilent, США) на электрофоретической системе Bioanalyzer 2000 (Agilent, США). На следующем этапе при помощи термостабильной полимеразы к 3'-концам фрагментов ДНК добавлялся дезоксиаденин (dA), затем проводилось лигирование баркодов IonXpress (Thermo Fisher Scientific, США). После лигирования библиотеку амплифицировали с праймерами Library Amplification Primer Mix (Thermo Fisher Scientific, США) (99 °C / 2 мин – 1 цикл; 99 °C / 15 с, 60 °C / 8 мин – 15 циклов), затем ДНК снова очищали 1-кратным объемом магнитных частиц Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, США).

Целевое обогащение проводили согласно протоколу, рекомендованному производителем [934], с помощью одной или двух последовательных гибридизаций смеси из библиотек ДНК с биотинилированными пробами SeqCapEZ (Roche, США) согласно протоколу производителя [805]. Гибридизованные фрагменты очищались с помощью магнитных частиц со стрептавидином Dynabeads M-270 (Invitrogen, США). После очистки проводили 5 циклов амплификации гибридизованных фрагментов ДНК с олигонуклеотидами Library Amplification Primer Mix. Обогащенную библиотеку ДНК очищали с помощью магнитных частиц Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, США). Вторую гибридизацию проводили по тому же протоколу [805].

Эмульсионную ПЦР обогащенной библиотеки и последующую загрузку на чип осуществляли при помощи прибора для автоматиче-

ской пробоподготовки Ion Chef согласно рекомендациям производителя [933].

Секвенирование проводили на секвенаторе Ion S5 согласно рекомендациям производителя [935].

Характеристика анализируемых панелей приведена в табл. 77.

Таблица 77. Характеристика библиотек (SeqCap EZ, Nimblegen), используемых при секвенировании

Название панели	Размер панели, Мб	Количество генов в панели	Расчетная глубина покрытия	Средняя глубина покрытия	Покрывание целевых областей не менее 20x, %
Несовершенный остеогенез	0,21	20	300	254	99,5
Нефротический синдром	0,45	57	200	182	98,4
Кардиомиопатии	0,65	75	200	178	98,5
Гликогеновые болезни	0,11	20	200	189	99,6

ПРИЛОЖЕНИЕ М

Мультиплексная лигазозависимая амплификация проб

Для поиска делеций и дупликаций в целевых геномных областях применяли метод мультиплексной лигазозависимой амплификации проб (MLPA, сокр. от англ. Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification). Исследования проводили с использованием наборов реагентов производства компании MRC-Holland (Нидерланды). Амплификацию и лигирование проводили на термоциклерах Bio-Rad T100 (Bio-Rad, США) и ProFlex (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколам, рекомендованным производителем [686]. Капиллярный электрофорез осуществляли на автоматическом секвенаторе ДНК ABI 3500 (Thermo Fisher Scientific, США). Анализ полученных данных проводили в компьютерной программе Coffalyser, рекомендованной производителем наборов [686].

Для поиска делеций и дупликаций в гене *IDS* при диагностике синдрома Хантера применяли набор реагентов MLPA P164-B2 (MRC Holland, Нидерланды), содержащий 24 олигонуклеотидные пробы с продуктами амплификации длиной от 136 до 373 п.н., а также 10 контрольных фрагментов.

Для поиска делеций и дупликаций в гене *GBA*, а также рекомбинаций между геном *GBA* и псевдогеном *GBAP* при диагностике болезни Гоше применяли набор реагентов MLPA P338 (MRC Holland, Нидерланды), содержащий 24 олигонуклеотидные пробы с продуктами амплификации длиной от 155 до 382 п.н., а также 9 контрольных фрагментов.

Для поиска делеций и дупликаций в гене *CTNS* при диагностике цистиноза применяли набор реагентов MLPA P473 (MRC Holland, Нидерланды), содержащий 17 олигонуклеотидных проб с продуктами амплификации длиной от 148 до 350 п.н., а также 14 контрольных фрагментов.

Для поиска делеций и дупликаций в гене *GAA* при диагностике БП применяли набор реагентов MLPA P453 (MRC Holland, Нидерланды), содержащий 27 олигонуклеотидных проб с продуктами амплификации длиной от 130 до 400 п.н., а также 9 контрольных фрагментов.



ПРИЛОЖЕНИЕ Н

Количественная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

Для валидации всех выявленных протяженных делеций и дупликаций проводили количественную ПЦР в режиме реального времени с использованием смеси с интеркалирующим красителем iQ™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, США). Амплификацию проводили в 25 мкл реакционной смеси на амплификаторе Bio-Rad CFX 96 (Bio-Rad, США) с использованием следующей программы: 95 °C / 3 мин – 1 цикл; 95 °C / 30 с, 60 °C / 30 с, 72 °C / 30 с – 40 циклов.

Результаты нормировали по уровню экспрессии референсного гена *HBB* в исследуемом образце, используя олигонуклеотиды HBB-F, TGGGCAACCCTAAGGTGAAG и HBB-R, GTGAGCCAGGCCATCACTAAA-3.



ПРИЛОЖЕНИЕ П

Молекулярно- цитогенетические исследования

Для поиска делеций и дупликаций свыше 50 т.п.н. применяли хромосомный микроматричный анализ. Анализ проводили с применением микрочипов высокой плотности CytoScan HD (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием системы анализа нуклеиновых кислот Геноскан 3000 (Геномед, Российская Федерация), согласно протоколу, рекомендованному производителем [932].

Качество и количество ДНК оценивали при помощи спектрофотометра NanoVue (GE Healthcare, Швеция), а также флуориметра нового поколения Qubit 3.0 (Invitrogen, США). На первом этапе проводили фрагментирование 250 нг геномной ДНК с помощью рестриктазы NspI и последующее лигирование адаптеров к полученным фрагментам в 25 мкл реакционной смеси. На следующем этапе проводили амплификацию на термоциклере ProFlex (Thermo Fisher Scientific, США) в 100 мкл реакционной смеси с помощью набора для амплификации Titanium™ DNA Amplification Kit (Clontech, США) (94 °C / 3 мин – 1 цикл; 94 °C / 30 с, 60 °C / 45 с, 68 °C / 15 с – 30 циклов; 68 °C / 7 мин – 1 цикл). Затем фрагменты ДНК, очищенные с помощью магнитных частиц Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, США), денатурировали, проводили мечение «лэйблинг» и гибридизовали на чипы. Затем проводили этап промывки и сканирования чипов. Данные обрабатывали с помощью встроенного программного обеспечения (Chromosome Analysis Suite).



ПРИЛОЖЕНИЕ Р

Биоинформатический анализ

Анализ качества полученных геномных данных, а также картирование прочтений проводились при помощи встроенного программного обеспечения Torrent Suite Software и Torrent Server (Thermo Fisher Scientific, США). Поиск и аннотация выявленных вариантов проводились при помощи программы IonReporter (Thermo Fisher Scientific, США). Дальнейший анализ осуществляли в программах Alamut Batch и Alamut Focus (Interactive Biosoftware, Франция). Все найденные минорные варианты исследованных генов в кодирующих и прилегающих интронных областях с частотами встречаемости менее 1% в соответствии с информационной базой gnomAD [376] были подвергнуты биоинформатическому анализу в программе Alamut Visual (Interactive Biosoftware, Франция) и валидированы далее при помощи метода двунаправленного секвенирования по Сэнгеру. Последовательности нуклеотидов сравнивались с референсной базой данных GenBank Accession [372] с использованием программы Geneious, версия R10 (Biomatters, Новая Зеландия). Патогенность нуклеотидных вариантов определялась с помощью Руководства по интерпретации данных последовательности ДНК человека [51], основанного на стандартах ACMG [801]. Значимые изменения референсной последовательности ДНК были подвергнуты семейному анализу. Для номенклатуры мутаций были использованы рекомендации HGVS [478].

ПРИЛОЖЕНИЕ С

Статистическая обработка результатов исследований

Для статистического анализа полученных результатов применялся пакет Statistica 10.0 (StatSoft, IBM Америка) [50]. Для количественных данных применялся медианный тест, критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони, критерий Краскела–Уоллиса, критерий Уилкоксона. Для бинарных признаков применялся критерий хи-квадрат Пирсона и точный критерий Фишера с поправкой Бонферрони. Для обсчета данных по значению активностей α -галактозидазы А, α -1,4-глюкозидазы, β -D-глюкоцереброзидазы, и α -L-идуронидазы, а также концентрации сукцинилацетона, тирозина, цистина, лизо-Гб3 и лизо-Гл1 использовался пакет программ Bruker Data Analysis 4.1. Для определения оптимальной отрезной точки, соответствующей максимальным показателям чувствительности и специфичности разработанных методик, применяли метод ROC-анализа, согласно протоколу, предложенному Griner и соавторами [403]. Обсчет был реализован с помощью программы SPSS [9] и среды программирования R [784]. В случае недостаточного количества экспериментальных данных отрезные точки выбирались на основе опубликованных литературных данных с учетом полученных нами референсных интервалов. Расчет референсных интервалов проводили с учетом рекомендаций Horn и соавторов [452].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеева, Е.И. Клинические и молекулярно-генетические особенности аутовоспалительных синдромов у детей / Е.И. Алексеева, К.В. Савостьянов, Т.В. Слепцова [и др.] // Вопросы современной педиатрии. – 2015. – Т. 14, № 3. – С. 363–373.
2. Антонец, А.В. Роль тандемной масс-спектрометрии в неонатальном скрининге наследственных болезней обмена веществ : дис. ... канд. мед. наук :03.02.07 / Антонец Анна Валерьевна; ГОУ ВПО «Белгородский государственный университет». – Белгород, 2013. – 121 с.
3. Баранов, А.А. Ведение детей с болезнью Гоше. Современные клинические рекомендации / А.А. Баранов, Л.С. Намазова-Баранова, О.С. Гундобина [и др.] // Педиатрическая фармакология. – 2016. – Т. 13, № 3. – С. 244–250.
4. Баранов, А.А. Дефицит лизосомной кислой липазы: клинические рекомендации по оказанию медицинской помощи детям / А.А. Баранов, Л.С. Намазова-Баранова, О.С. Гундобина [и др.] // Педиатрическая фармакология. – 2016. – Т. 13, № 3. – С. 239–243.
5. Баранов, А.А. Клинические рекомендации по диагностике и лечению гипофосфатазии у детей / А.А. Баранов, Л.С. Намазова-Баранова, К.В. Савостьянов [и др.] // Педиатрическая фармакология. – 2016. – Т. 13, № 6. – С. 539–543.
6. Баранов, А.А. Проблемы диагностики муковисцидоза и пути их решения в России / А.А. Баранов, Н.И. Капранов, Н.Ю. Каширская, [и др.] // Педиатрическая фармакология. – 2014. – Т. 11, № 6. – С. 16–23.
7. Бейер, Е.М. Биохимическая и генетическая диагностика болезни Гоше и фенотипическая гетерогенность заболевания / Е.М. Бейер, Т.М. Букина, И.В. Цветкова // Вопросы медицинской химии. – 2000. – Т. 46, № 5. – С. 451–454.
8. Букина, Т.М. Биохимическая и молекулярно-генетическая характеристика болезни Гоше у российских пациентов : дис. ... канд. биол. наук : 03.00.15 / Букина, Татьяна Михайловна; ГУ МГНЦ РАМН. – М., 2005. – 115 с.
9. Бююль, А. SSPS: Искусство обработки информации. Анализ статистических данных и восстановление скрытых закономерностей : пер. с нем/ Ахим Бююль, Петер Цёфель. – СПб: ООО «ДиаСофтЮп», 2005.– 608 с.
10. Волгина, С.Я. Диагностика и лечение болезни Фабри у детей раннего возраста / С.Я. Волгина, А.Ю. Асанов, А.А. Соколов // Российский педиатрический журнал. – 2015. – Т. 18, № 6. – С. 41–45.
11. Волгина, С.Я. Ранняя диагностика болезни Фабри у детей / С.Я. Волгина // Современная медицина. Избранные вопросы. – 2016. – № 4(4). – С. 58–60.
12. Гандаева, Л.А. Болезнь Данон у детей: взгляд детского кардиолога / Л.А. Гандаева, Е.Н. Басаргина, О.П. Жарова [и др.] // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2021. – Т. 66, № 3. – С. 110–117. DOI: 10.21508/1027-4065-2021-66-3-110-117
13. Гандаева, Л.А. Хирургическое лечение обструктивной формы гипертрофической кардиомиопатии у детей с синдромом Нунан / Л.А. Гандаева, Е.Н. Басаргина, О.Б. Кондакова, К.В. Савостьянов // Российский педиатрический журнал. – 2022. – Т. 25, № 2. – С. 96–105. DOI: 10.46563/1560-9561-2022-25-2-96-105



14. Гинтер, Е.К. Наследственные болезни в российских популяциях/ Е.К. Гинтер, Р.А. Зинченко // Вестник ВОГиС. – 2006. – Т. 10, № 1 – С. 106–125.
15. Голивец, Л.Т. Болезнь Фабри (клинико-биохимический и молекулярно-генетический анализ у российских пациентов) :дис. ... канд. мед. наук : 03.02.07 / Голивец Лидия Тухфатовна; ФБГНУ МГНЦ. – М., 2015. – 165 с.
16. Голивец, Л.Т. Болезнь Фабри: Молекулярный анализ и клинико-генетические сопоставления / Л.Т. Голивец, В.П. Федотов, С.Е. Созин [и др.] // Медицинская генетика. – 2012. – Т. 11, № 5(119). – С. 29–37.
17. Гундобина, О.С. Диагностика и лечение болезни Гоше у детей. Клинический пример / О.С. Гундобина, Н.В. Гольцова // Доктор.Ру. – 2011. – № 2 (61). – С. 32–36.
18. 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 [и др.] // Педиатрическая фармакология. – 2018. – Т. 15, № 2. – С. 175–178. DOI: 10.15690/pf.v15i2.1874
19. Журкова, Н.В. Нунан-подобный синдром с потерей анагена: три клинических случая / Н.В. Журкова, К.А. Казакова, М.А. Варичкина [и др.] // Неврологический журнал им. Л.О. Бадаляна. – 2020. – Т. 1, № 3. – С. 188–196. DOI: 10.17816/2686-8997-2020-1-3-188-196
20. Журкова, Н.В. Спектр заболеваний из группы RAS-патий в многопрофильном педиатрическом стационаре / Н.В. Журкова, Л.А. Гандаева, А.А. Пушков [и др.] // Медицинская генетика. – 2020. – Т. 19, № 8(217). – С. 21–23. DOI: 10.25557/2073-7998.2020.08.21-23
21. Захарова, Е.Ю. Массовый скрининг на наследственные болезни: ключевые вопросы / Е.Ю. Захарова, В.Л. Ижевская, Г.В. Байдакова [и др.] // Медицинская генетика. – 2017. – Т. 16, № 10. – С. 3–13.
22. Игнатович, О.Н. VI тип несовершенного остеогенеза. Наблюдение редкого случая / О.Н. Игнатович, Л.С. Намазова-Баранова, Т.В. Маргиева [и др.] // Педиатрическая фармакология. – 2019. – Т. 16, № 1. – С. 30–35. DOI: 10.15690/pf.v16i1.2001
23. Игнатович, О.Н. Несовершенный остеогенез, тип VIII. Первое в России описание редкого случая. Актуальность молекулярно-генетического обследования / О.Н. Игнатович, К.В. Савостьянов, А.А. Пушков [и др.] // Вопросы практической педиатрии. – 2021. – Т. 16, № 4. – С. 141–147. DOI: 10.20953/1817-7646-2021-4-141-147
24. Игнатович, О.Н. Несовершенный остеогенез: особенности диагностики / О.Н. Игнатович, Л.С. Намазова-Баранова, Т.В. Маргиева [и др.] // Педиатрическая фармакология. – 2018. – Т. 15, № 3. – С. 224–232.
25. Клинические рекомендации : Болезнь Гоше у детей. МКБ 10 : E75.2 / С.А. Баранов, Л.С. Намазова-Баранова, С.И. Куцев [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.
26. Клинические рекомендации : Болезнь Помпе. МКБ 10 : E74.0 / С.Б. Артемьева, Е.Н. Архипова, А.А. Баранов [и др.]; Союз педиатров России; Российское общество медицинских генетиков. – Утв. Минздравом России. – М., 2017. – 48 с. – Режим доступа: http://www.pediatr-russia.ru/sites/default/files/file/kr_pompe.pdf.

27. Клинические рекомендации : Болезнь Фабри. МКБ 10 : E75.2 / С.И. Куцев, А.А. Баранов, Л.С. Намазова-Баранова [и др.]; Ассоциация медицинских генетиков; Союз педиатров России. – Утв. Минздравом России. – М., 2019. – 48 с. – Режим доступа: <http://amg-genetics.ru/pdf/fabri.pdf>.
28. Клинические рекомендации : Мукополисахаридоз I типа у детей. МКБ 10 : E76.0 / А.А. Баранов, Л.С. Намазова-Баранова, С.И. Куцев [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.
29. Клинические рекомендации : Мукополисахаридоз II типа у детей. МКБ 10 : E76.1 / А.А. Баранов, Л.С. Намазова-Баранова, С.И. Куцев [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.
30. Клинические рекомендации : Наследственная тирозинемия I типа у детей. МКБ 10 : E70.2 / А.А. Баранов, Л.С. Намазова-Баранова, Т.В. Боровик [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.
31. Костарева, А.А. Генетический спектр идиопатической рестриктивной кардиомиопатии / А.А. Костарева, А.Я. Гудкова, Т.М. Первунина [и др.] // Кремлевская медицина. Клинический вестник. – 2017. – № 1. – С. 39–46.
32. Кузенкова, Л.М. Болезнь Фабри: особенности заболевания у детей и подростков / Л.М. Кузенкова, Л.С. Намазова-Баранова, Т.В. Подклетнова [и др.] // Вопросы современной педиатрии. – 2015. – Т. 14, № 3. – С. 341–348.
33. Мазанкова, Л.Н. Трудности диагностики болезни Помпе у детей грудного возраста / Л.Н. Мазанкова, Н.П. Котлукова, С.Г. Сорока [и др.] // Педиатрия. – 2005. – Т. 84, № 6. – С. 89–92.
34. Мазанова, Н.Н. Биохимическая и молекулярно-генетическая диагностика тирозинемии I типа у российских больных / Н.Н. Мазанова, К.В. Савостьянов, Л.С. Намазова-Баранова [и др.] // Российский педиатрический журнал. – 2017. – Т. 20, № 2. – С. 68–73. – DOI: 10.18821/1560-9561-2017-20-2-68-73
35. Милованова, А.М. Исследование генетических причин врожденного и инфантильного нефротического синдрома у российских детей / А.М. Милованова, А.А. Пушков, К.В. Савостьянов [и др.] // Нефрология и диализ. – 2021. – Т. 23, № 1. – С. 57–72.
36. Милованова, А.М. Особенности врожденного и инфантильного нефротического синдрома у российских детей / А.М. Милованова, П.В. Ананьин, Т.В. Вашурин [и др.] // Российский педиатрический журнал. – 2021. – Т. 24, № 6. – С. 381–388. DOI: 10.46563/1560-9561-2021-24-6-381-388
37. 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.
38. Мовсисян, Г.Б. Демографическая и клиничко-генетическая характеристика детей с болезнью Гоше в Российской Федерации: Данные педиатрического регистра / Г.Б. Мовсисян, О.С. Гундобина, Л.С. Намазова-Баранова [и др.] // Педиатрическая фармакология. – 2016. – Т. 13, № 4. – С. 354–361. DOI: 10.15690/pf.v13i4.1607
39. 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

40. 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 [и др.] // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2017. – Т. 72, № 5. – С. 383–392. DOI: 10.15690/vramn792

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

42. Намазова-Баранова, Л.С. Семилетний опыт терапии нитизиноном наследственной тирозинемии 1-го типа в России / Л.С. Намазова-Баранова, С.И. Полякова, Т.Э. Боровик [и др.] // Эффективная фармакотерапия. – 2015. – № 1(3). – С. 24–31.

43. Павленко, Е.В. Регистр взрослых больных с некомпактным миокардом левого желудочка: классификация клинических форм и проспективная оценка их прогрессирования / Е.В. Павленко, О.В. Благова, Н.В. Вариончик [и др.] // Российский кардиологический журнал. – 2019. – Т. 24, № 2. – С. 12–25. DOI: 10.15829/1560-4071-2019-2-12-25

44. 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.

45. 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.

46. Петросян, Э.К. Врожденный нефротический синдром: этиология, диагностика и лечение / Э.К. Петросян // Вестник современной клинической медицины. – 2013. – № 6(6). – С. 70–78. DOI: 10.20969/VSKM.2013.6(6).70-78

47. Полякова, С.И. Наследственная тирозинемия 1-го типа: что нужно знать педиатрам / С.И. Полякова, К.В. Савостьянов, А.А. Пушков // Практика педиатра. – 2014, февраль. – С. 4–16.

48. Приходина, Л.С. Инфантильный нефротический синдром: клинико-морфологическая характеристика, генетическая гетерогенность, исходы. Опыт одного центра / Л.С. Приходина, С.В. Папиж, Е.С. Столяревич [и др.] // Нефрология и диализ. – 2019. – Т. 21, № 2. – С. 234–242. DOI: 10.28996/2618-9801-2019-2-234-242

49. Пушков, А.А. Молекулярная диагностика болезни Краббе у российских детей / А.А. Пушков, Н.Н. Мазанова, Л.М. Кузенкова [и др.] // Неврологический журнал им. Л.О. Бадаляна. – 2020. – Т. 1, № 1. – С. 21–28. DOI: 10.17816/2686-8997-2020-1-01-21-28

50. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета программ Statistica / О.Ю. Реброва. – М., МедиаСфера, 2006. – 312 с.

51. 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 [и др.] // Медицинская генетика. – 2019. – Т. 18, № 2. – С. 3–23.
52. 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 др.] // Российский педиатрический журнал. – 2017. – Т. 20, № 3. – С. 132–139. DOI: 10.18821/1560-9561-2017-20-3-132-139
53. 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
54. Савостьянов, К.В. Молекулярно-генетические особенности формирования рестриктивной кардиомиопатии у российских детей / К.В. Савостьянов, Е.Н. Басаргина, Е.Е. Рябова [и др.] // Российский кардиологический журнал. – 2021. – Т. 26, № 10. – С. 52–62. DOI: 10.15829/1560-4071-2021-4590
55. Савостьянов, К.В. Молекулярные и клинические особенности мукополисахаридоза I типа у 54 российских пациентов / К.В. Савостьянов, Л.М. Кузенкова, А.А. Пушков [и др.] // Медицинский оппонент. – 2021. – № 4(16). С. 59–64.
56. 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 [и др.] // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2017. – Т. 72, № 4. – С. 242–253. DOI: 10.15690/vramn872
57. Савостьянов, К.В. Селективный скрининг и молекулярная характеристика российских пациентов с болезнью Помпе / К.В. Савостьянов, А.А. Пушков, Е.Н. Басаргина [и др.] // Неврологический журнал им. Л.О. Бадаляна. – 2021. – Т. 2, № 4. – С. 203–215. DOI: 10.46563/2686-8997-2021-2-4-203-215
58. Савостьянов, К.В. Хромато-масс-спектрометрическая и молекулярно-генетическая диагностика цистиноза у российских детей / К.В. Савостьянов, Н.Н. Мазанова, А.А. Пушков [и др.] // Педиатрия. – 2018. – Т. 97, № 5. – С. 71–78.
59. Светличная, Д. Биохимическая и молекулярно-генетическая диагностика тирозинемии, тип I / Д. Светличная, Л. Муравьева, Н. Журкова [и др.] // Медицинская генетика. – 2015. – Т. 14, № 1.– С. 13.
60. Сдвигова, Н. А. Значимость генетической верификации диагноза для детей с дилатационным фенотипом кардиомиопатии с некомпактным миокардом и повышенной трабекулярностью / Н.А. Сдвигова, Е.Н. Басаргина, К.В. Савостьянов [и др.] // Российский педиатрический журнал. – 2021. – Т. 24, № 3. – С. 173–180. DOI: 10.46563/1560-9561-2021-24-3-173-180
61. Семячкина, А.Н. Болезнь накопления гликогена, тип II (болезнь Помпе) у детей / А.Н. Семячкина, В.С. Сухоруков, Т.М. Букина // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2014. – Т. 59, № 4. – С. 48–55.
62. Сладков, Д.Г. Новый метод молекулярно-генетической диагностики стероидрезистентного нефротического синдрома / Д.Г. Сладков, К.В. Савостьянов,

А.Н. Цыгин [и др.] // Медицинская генетика. – 2016. – Т. 15, № 5(167). – С. 38–41. DOI: 10.1234/XXXX-XXXX-2016-5-38-41

63. Сурков, А.Н. Две новые мутации в гене *SLC37A4* у ребенка с гликогеновой болезнью Ib типа / А.Н. Сурков, А.А. Баранов, Л.С. Намазова-Баранова [и др.] // Молекулярная медицина. – 2017. – Т. 15, № 1. – С. 40–44.

64. Цыгин, А. Нефротический синдром // Детская нефрология: Практическое руководство / А. Цыгин; под ред. Э. Лойманна, А.Н. Цыгина, А.А. Саркисяна. – М.: Литтерра, 2010. – С. 123–140.

65. Цыгин, А.Н. Федеральные клинические рекомендации по оказанию помощи детям с гемолитико-уремическим синдромом / А.Н. Цыгин, Т.В. Вашурина, Т.В. Маргиева [и др.] // Педиатрическая фармакология. – 2015. – Т. 12, № 4. – С. 447–455.

66. Яхяева, Г.Т. V тип несовершенного остеогенеза. Наблюдение редкого случая / Г.Т. Яхяева, Т.В. Маргиева, Л.С. Намазова-Баранова [и др.] // Педиатрическая фармакология. – 2015. – Т. 12, № 1. – С. 79–84. DOI: 10.15690/pf.v12i1.1251

67. Abderhalden, E. Familiarecystindiathese / E. Abderhalden // Z. Phys. Chem. – 1903. – No. 38. – Pp. 557–561.

68. Abrahamov, A. Gaucher's disease variant characterised by progressive calcification of heart valves and unique genotype / A. Abrahamov, D. Elstein, V. Gross-Tsur [et al.] // Lancet. – 1995. – Vol. 346, no. 8981. – Pp. 1000–1003. DOI: 10.1016/s0140-6736(95)91688-1

69. Abukabbos, H. Clinical manifestations and dental management of dentinogenesis imperfecta associated with osteogenesis imperfecta: Case report / H. Abukabbos, F. Al-Sineedi // Saudi Dent. J. – 2013 – Vol. 25, no. 4. – Pp. 159–165. DOI: 10.1016/j.sdentj.2013.10.004

70. Achouitar, S. Common mutation in the PHKA2 gene with variable phenotype in patients with liver phosphorylase b kinase deficiency / S. Achouitar, J.L. Goldstein, M. Mohamed [et al.] // Mol. Genet. Metab. – 2011. – Vol. 104, no. 4. – Pp. 691–694. DOI: 10.1016/j.ymgme.2011.08.021

71. Ackerman, M.J. HRS/EHRA Expert Consensus Statement on the State of Genetic Testing for the Channelopathies and Cardiomyopathies / M.J. Ackerman, S.G. Priori, S. Willems [et al.] // Heart Rhythm. – Vol. 8, no. 8. – Pp. 1308–1339. DOI: 10.1016/j.hrthm.2011.05.020

72. Adam, M.P. Marshall-Smith syndrome: natural history and evidence of an osteochondrodysplasia with connective tissue abnormalities / M.P. Adam, R.C. Hennekam, L.D. Keppen [et al.] // Am. J. Med. Genet. A. – 2005. – Vol. 137, no. 2. – Pp. 117–124. DOI: 10.1002/ajmg.a.30580

73. Adeva-Andany, M. Glycogen metabolism in humans / M. Adeva-Andany, M. González-Lucán, C. Donapetry-García [et al.] // BBA Clin. – 2016. – No. 5. – Pp. 85–100. DOI: 10.1016/j.bbacli.2016.02.001

74. Aerts, J.M. Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease / J.M. Aerts, J.E. Groener, S. Kuiper [et al.] // Proc. Nat. Acad. Sci. – 2008. – Vol. 105, no. 8. – Pp. 2812–2817. DOI: 10.1073/pnas.0712309105

75. Aetna Better Health. Enzyme-replacement Therapy for Lysosomal Storage Disorders : Clinical Policy Bulletin. – 2014 (Aug.). – Number 0442. – 24 p.

76. Aghion, H. La maladie de Gaucher dans l'enfance : PhD thesis / H. Aghion; Paris University, France. – Paris, 1934.
77. Akanuma, J. Glycogen storage disease type Ia: molecular diagnosis of 51 Japanese patients and characterization of slicing mutations by analysis of ectopically transcribed mRNA from lymphoblastoid cells / J. Akanuma, T. Nishigaki, K. Fujii [et al.] // *Am. J. Med. Genet.* – 2000. – Vol. 91, no. 2. – Pp. 107–112.
78. Akchurin, O. Genetic causes of proteinuria and nephrotic syndrome: impact on podocyte pathobiology / O. Akchurin, K.J. Reidy // *Pediatr. Nephrol.* – 2015. – Vol. 30, no. 2. – Pp. 221–233. DOI: 10.1007/s00467-014-2753-3
79. Alasmar, D. Gaucher disease in Syrian children: common mutations identification and clinical futures / D. Alasmar // *Ann. Saudi Med.* – 2015. – Vol. 35, no. 2. – Pp. 127–132. DOI: 10.5144/0256-4947.2015.127
80. Alcántara-Ortigoza, M.A. CTNS gene analysis emphasizes diagnostic of eye examination in patients with cystinosis / M.A. Alcántara-Ortigoza, A.B. Martínez-Bernal, L. Belmont-Martínez [et al.] // *J. Pediatr. Genet.* – 2013. – Vol. 2, no. 3. – Pp.129–132. DOI: 10.3233/PGE-13060
81. Aldenhoven, M. Hematopoietic cell transplantation for mucopolysaccharidosis patients is safe and effective: results after implementation of international guidelines / M. Aldenhoven, S.A. Jones, D. Bonney [et al.] // *Biol. Blood Marrow Transplant.* – 2015. – Vol. 21, no. 6. – Pp. 1106–1109. DOI: 10.1016/j.bbmt.2015.02.011
82. Aldenhoven, M. Long-term outcome of Hurler syndrome patients after hematopoietic cell transplantation: an international multicenter study / M. Aldenhoven, R.F. Wynn, P.J. Orchard, [et al.] // *Blood.* – 2015. – Vol. 125, no. 13. – Pp. 2164–2172. DOI: 10.1182/blood-2014-11-608075
83. Al-Dirbashi, O.Y. Improved method to determine succinylacetone in dried blood spots for diagnosis of tyrosinemia type 1 using UPLC-MS/MS / Al- O.Y. Dirbashi, S. Mohamed, M.S. Rashed [et al.] // *Biomed. Chromatogr.* – 2008. – Vol. 22, no. 11. – Pp. 1181–1185. DOI: 10.1002/bmc.1049
84. Al-Haggag, M. Cystinosis as a lysosomal storage disease with multiple mutant alleles: Phenotypic-genotypic correlations / M. Al-Haggag // *World J. Nephrol.* – 2013. – Vol. 2, no. 4. – Pp. 94–102. DOI: 10.5527/wjn.v2.i4.94
85. Al-Hamed, M. A molecular genetic analysis of childhood nephrotic syndrome in a cohort of Saudi Arabian families / M. Al-Hamed, E. Al-Sabban, H. Al-Mojalli [et al.] // *J. Hum. Genet.* – 2013. – No. 58. – Pp. 480–489. DOI: 10.1038/jhg.2013.27
86. Amaral, O. Type 1 Gaucher disease: Identification of N396T and prevalence of glucocerebrosidase mutations in the Portuguese/ O. Amaral, E. Pinto, M. Fortuna [et al.] // *Hum Mutat.* – 1996. – Vol. 8, no. 3. – Pp. 280–281. DOI: 10.1002/(SICI)1098-1004(1996)8:3<280::AID-HUMU15>3.0.CO;2-Z
87. Amato, D. Gaucher disease: variability in phenotype among siblings / D. Amato, T. Stachiw, J.T. Clarke, G.E. Rivard // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2004. – Vol. 27, no. 5. – Pp. 659–669. DOI: 10.1023/b:boli.0000042983.60840.f3
88. Amir, O. The value of cardiac magnetic resonance imaging in the diagnosis of isolated non-compaction of the left ventricle / O. Amir, R.M. Delgado 3rd, B. Kar, F.W. Smart // *Isr. Med. Assoc. J.* – 2009. – Vol. 11, no. 5. – Pp. 313–314.

89. Andersen, D.H. Familial cirrhosis of the liver with storage of abnormal glycogen / D.H. Andersen // *Lab. Invest.* – 1956. – Vol. 5, no. 1. – Pp. 11–20.
90. Anderson, W. A case of “angio-keratoma” / W. Anderson // *Br. J. Derm.* – 1898. – No. 10. – Pp. 113–117.
91. Anderson, W.E. Type VI Glycogen Storage Disease / W.E. Anderson, G.T. Griffing (Ed.) // *Medscape.* – 2019 (Feb). Available at: <https://emedicine.medscape.com/article/119873-overview>.
92. Andrade, J. Screening for Fabry Disease in Patients with Chronic Kidney Disease: Limitations of Plasma α -Galactosidase Assay as a Screening Test / J. Andrade, P.J. Waters, R.S. Singh [et al.] // *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* – 2008. – Vol. 3, no. 1. – Pp. 139–145. DOI: 10.2215/CJN.02490607
93. Angelini, C. Glycogen storage diseases of muscle / C. Angelini, A. Martinuzzi, L. Vergani // *Handbook of muscle diseases* / R. Lane (Ed.). – New York: Marcel Dekker, 1996. – P. 407.
94. Angileri, F. Geographical and ethnic distribution of mutations of the fumarylacetoacetate hydrolase gene in hereditary tyrosinemia type 1 / F. Angileri, A. Bergeron, G. Morrow [et al.] // *JIMD Rep.* – 2015. – Vol. 19. – Pp. 43–58. DOI: 10.1007/8904_2014_363
95. Anikster, Y. CTNS mutations in patients with cystinosis / Y. Anikster, V. Sbotelersuk, W.A. Gahl // *Hum. Mutat.* – 1999. – Vol. 14, no. 6. – Pp. 454–458.
96. Anikster, Y. Identification and detection of the common 65-kb deletion breakpoint in the nephropathic cystinosis gene (CTNS) / Y. Anikster, C. Lucero, J.W. Touchman [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* – 1999. – Vol. 66, no. 2. – Pp. 111–116. DOI: 10.1006/mgme.1998.2790
97. Anikster, Y. Ocular non-nephropathic cystinosis: clinical, biochemical, and molecular correlations / Y. Anikster, C. Lucero, J. Guo [et al.] // *Pediatr. Res.* – 2000. – Vol. 47, no. 1. – Pp. 17–23. DOI: 10.1203/00006450-200001000-00007
98. Aoyama, Y. Molecular features of 23 patients with glycogen storage disease type III in Turkey: a novel mutation p.R1147G associated with isolated glucosidase deficiency, along with 9 AGL mutations / Y. Aoyama, I. Ozer, M. Demirkol [et al.] // *J. Hum. Genet.* – 2009. – Vol. 54, no. 11. – Pp. 681–686. DOI: 10.1038/jhg.2009.100
99. Applegarth, D.A. Incidence of inborn errors of metabolism in British Columbia, 1969–1996 / D.A. Applegarth, J.R. Toone, R.B. Lowry // *Pediatrics.* – 2000. – Vol. 105, no. 1, e10. – 8 p. DOI: 10.1542/peds.105.1.e10
100. Arbustini, E. The MOGE(S) classification for a phenotype-genotype nomenclature of cardiomyopathy / E. Arbustini, N. Narula, L. Tavazzi [et al.] // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2014. – Vol. 64, no. 3. – Pp. 304–318.
101. Arimura, T. Cardiac ankyrin repeat protein gene (ANKRD1) mutations in hypertrophic cardiomyopathy / T. Arimura, J.M. Bos, A. Sato [et al.] // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2009. – Vol. 54, no. 4. – Pp. 334–342. DOI: 10.1016/j.jacc.2008.12.082
102. Arn, P. Airway-related symptoms and surgeries in patients with mucopolysaccharidosis I / P. Arn, I.A. Bruce, J.E. Wraith // *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* – 2015. – Vol. 124, no. 3. – Pp. 198–205. DOI: 10.1177/0003489414550154
103. Asami, T. Effect of clonidine on the height of a child with glycogen storage disease type VI: A 13 year follow-up study / T. Asami, T. Kikuchi, K. Asami // *Acta Paediatr. Jpn.* – 1996. – Vol. 38, no. 5. – Pp. 524–528. DOI: 10.1111/j.1442-200x.1996.tb03538.x

104. Ashton-Prolla, P. Fabry disease: Twenty-two novel mutations in the alpha-galactosidase A gene and genotype/phenotype correlations in severely and mildly affected hemizygotes and heterozygotes / P. Ashton-Prolla, B. Tong, J. Shabbeer [et al.] // *J. Investig. Med.* – 2000. – Vol. 48, no. 4. – Pp. 227–235.
105. Assereto, S. Null mutations and lethal congenital form of glycogen storage disease type IV. *Biochem / S. Assereto, O.P. van Diggelen, L. Diogo [et al.] // Biophys. Res. Commun.* – 2007. – Vol. 361, no. 2. – Pp. 445–450. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.07.074
106. Augusciak-Duma, A. Mutations in the COL1A1 and COL1A2 genes associated with osteogenesis imperfecta (OI) types I or III / A. Augusciak-Duma, J. Witecka, A.L. Sieron [et al.] // *Acta Biochim. Pol.* – 2018. – Vol. 65, no. 1. – Pp. 79–86. DOI: 10.18388/abp.2017_1612
107. Ausems, M.G. Frequency of glycogen storage disease type II in the Netherlands: implications for diagnosis and genetic counseling / M.G. Ausems, J. Verbiest, M.P. Hermans [et al.] // *Eur. J. Hum. Genet.* – 1999.– Vol. 7, no. 6. – Pp. 713–716. DOI: 10.1038/sj.ejhg.5200367
108. Austin, S.L. Cardiac Pathology in Glycogen Storage Disease Type III / S.L. Austin, A.D. Proia, M.J. Spencer-Manzon [et al.] // *JIMD Rep.* – 2012. – Vol. 6. – Pp. 65–72. DOI: 10.1007/8904_2011_118
109. Baber, M.D. A case of congenital cirrhosis of the liver with renal tubular defects akin to those in the Fanconi syndrome / M.D. Baber // *Arch. Dis. Child.* – 1956. – Vol. 31, no. 159. – Pp. 335–339. DOI: 10.1136/adc.31.159.335
110. Baehner, F. Cumulative incidence rates of the mucopolysaccharidoses in Germany / F. Baehner, C. Schmiedeskamp, F. Krummenauer [et al.] // *J. Inherit. Metab. Dis.*– 2005. – Vol. 28, no. 6. – Pp. 1011–1017. DOI: 10.1007/s10545-005-0112-z
111. Baig, M.K. Familial dilated cardiomyopathy: cardiac abnormalities are common in asymptomatic relatives and may represent early disease / M.K. Baig, J.H. Goldman, A.P. Caforio [et al.] // *J Am Coll Cardiol.* – 1998. – Vol. 31, no. 1. – Pp. 195–201. DOI: 10.1016/s0735-1097(97)00433-6
112. Baird, P.A. Genetic disorders in children and young adults: a population study / P.A. Baird, T.W. Anderson, H.B. Newcombe [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 1988. – Vol. 42, no. 5. – Pp. 677–693.
113. Balasubramanian, M. Genotype-phenotype study in type VI osteogenesis imperfect / M. Balasubramanian, M.J. Parker, A. Dalton [et al.] // *Clin. Dysmorphol.* – 2013. – Vol. 22, no. 3. – Pp. 93–101. DOI: 10.1097/MCD.0b013e32836032f0
114. Bao, Y. Isolation and nucleotide sequence of human liver glycogen debranching enzyme mRNA: identification of multiple tissue-specific isoforms / Y. Bao, B.Z. Yang, T.L. Dawson, Y.T. Chen // *Gene.* – 1997. – Vol. 197, no. 1–2. – Pp. 389–398. DOI: 10.1016/s0378-1119(97)00291-6
115. Baranov, A.A. Clinical guidelines on the provision of medical aid to children with hereditary tyrosinemia type I / A.A. Baranov, L.S. Namazova-Baranova, S.I. Kutsev [et al.]. – M.: Evita, 2015. 17 c. (*in Russian*)
116. Barnes, A.M. Absence of FKBP10 in recessive type XI osteogenesis imperfecta leads to diminished collagen cross-linking and reduced collagen deposition in extracellular matrix / A.M Barnes, W.A. Cabral, M. Weis [et al.] // *Hum. Mutat.* – 2012. – Vol. 33, no. 11. – Pp. 1589–1598. DOI: 10.1002/humu.22139



117. Barnes, A.M. Deficiency of cartilage-associated protein in recessive lethal osteogenesis imperfecta / A.M. Barnes, W. Chang, R. Morello [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2006. – Vol. 355, no. 26. – Pp. 2757–2764. DOI: 10.1056/NEJMoa063804
118. Barranger, J.A. Genetic heterogeneity of Gaucher's disease / J.A. Barranger, G.J. Murray, E.I. Ginns // *Molecular Basis of Lysosomal Storage Disorders* / Ed.: J.A. Barranger, R.O. Brady. – 1984. – Pp. 311–323. DOI: 10.1016/B978-0-120-79280-1.X5001-3
119. Barsheshet, A. Genetics of Sudden Cardiac Death / A. Barsheshet, A. Brenyo, A. Moss [et al.] // *Curr. Cardiol. Rep.* – 2011. – Vol. 13, no. 5. – Pp. 364–376. DOI: 10.1007/s11886-011-0209-y
120. Bartlett, D.C. Early nitisinone treatment reduces the need for liver transplantation in children with tyrosinaemia type 1 and improves post-transplant renal function / D.C. Bartlett, C. Lloyd, P.J. McKiernan, P.N. Newsome // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2014. – Vol. 37, no. 5. – Pp. 745–752. DOI: 10.1007/s10545-014-9683-x
121. Bartlett, D.C. Plasma succinylacetone is persistently raised after liver transplantation in tyrosinaemia type 1 / D.C. Bartlett, M.A. Preece, E. Holme [et al.] // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2013. – Vol. 36, no. 1. – Pp. 15–20. DOI: 10.1007/s10545-012-9482-1
122. Baskin, B. TMEM43 mutations associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in non-Newfoundland populations / B. Baskin, J.R. Skinner, S. Sanatani [et al.] // *Hum. Genet.* – 2013. – Vol. 132, no. 11. – Pp. 1245–1252. DOI: 10.1007/s00439-013-1323-2
123. Bauce, B. Comparison of clinical features of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in men versus women / B. Bauce, G. Frigo, F.I. Marcus [et al.] // *Am. J. Cardiol.* – 2008. – Vol. 102, no. 9. – Pp. 1252–1257. DOI: 10.1016/j.amjcard.2008.06.054
124. Baumann, U. Hyperinsulinism in tyrosinaemia type I / U. Baumann, M.A. Preece, A. Green [et al.] // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2005. – Vol. 28, no. 2. – Pp. 131–135. DOI: 10.1007/s10545-005-5517-1
125. Beals, J.K. Gaucher Disease Mutation Carriers at Higher Risk for Parkinson's Disease / J.K. Beals // *MedscapeMedical News : Proc. of the Am. Soc. Hum Genet (ASHG) 58th Ann. Meet. (ASHG 2008), Philadelphia, Pennsylvania, USA, 11–15 November, 2008.* – Available at: <https://www.medscape.com/viewarticle/583839>.
126. Beauchamp, N.J. High frequency of missense mutations in glycogen storage disease type VI / N.J. Beauchamp, J. Taybert, M.P. Champion [et al.] // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2007. – Vol. 30, no. 5. – Pp. 722–734. DOI: 10.1007/s10545-007-0499-9
127. Beck, M. The natural history of MPS I: global perspectives from the MPS I Registry / M. Beck, P. Arn, R. Giugliani [et al.] // *Genet. Med.* – 2014. – Vol. 16, no. 10. – Pp. 759–765. DOI: 10.1038/gim.2014.25
128. Becker, J.A. The African origin of the common mutation in African American patients with glycogen-storage disease type II / J.A. Becker, J. Vlach, N. Raben [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 1998. – Vol. 62, no. 4. – Pp. 991–994. DOI: 10.1086/301788
129. Beesley, C.E. Mutational analysis of 85 mucopolysaccharidosis type I families: frequency of known mutations, identification of 17 novel mutations and in vitro expression of missense mutations / C.E. Beesley, C.A. Meaney, G. Greenland [et al.] // *Hum Genet.* – 2001. – Vol. 109, no. 5. – Pp. 503–511. DOI: 10.1007/s004390100606
130. Beilin, A.K. Signatures of dermal fibroblasts from rdeb pediatric patients / A.K. Beilin, N.A. Evtushenko, N.G. Gurskaya [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22, no. 4. – Pp. 1–27.

131. Bembi, B. Diagnosis of glycogenosis type II / B. Bembi, E. Cerini, C. Danesino [et al.] // *Neurology*. – 2008. – Vol. 71, no. 23 (Suppl 2). – Pp. S4–11. DOI: 10.1212/WNL.0b013e31818da91e
132. Bendavid, C. FISH diagnosis of the common 57-kb deletion in CTNS causing cystinosis / C. Bendavid, R. Kleta, R. Long [et al.] // *Hum. Genet.* – 2004. – Vol. 115, no. 6. – Pp. 510–514. DOI: 10.1007/s00439-004-1170-2
133. Benoit, G. Hereditary nephrotic syndrome: a systematic approach for genetic testing and review of associated podocyte gene mutations / G. Benoit, E. Machuca, C. Antignac // *Pediatr. Nephrol.* – 2010. – Vol. 25, no. 9. – Pp. 1621–1632. DOI: 10.1007/s00467-010-1495-0
134. Benotti, J. Clinical profile of restrictive cardiomyopathy / J.R. Benotti, W. Grossman, P.F. Cohn // *Circulation*. – 1980. – Vol. 61, no. 6. – Pp. 1206–1212. DOI: 10.1161/01.cir.61.6.1206
135. Berg, J.M. *Biochemistry* // J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer. – 6th ed. – New York: W.H. Freeman and Co., 2007.
136. Bergman, A.J. Spectrum of mutations in the fumarylacetoacetate hydrolase gene of tyrosinemia type 1 patients in northwestern Europe and Mediterranean countries / A.J. Bergman, I.E. van den Berg, W. Brink [et al.] // *Hum. Mutat.* – 1998. – Vol. 12, no. 1. – Pp. 19–26.
137. Bertola, F. IDUA mutational profiling of a cohort of 102 European patients with mucopolysaccharidosis type I: identification and characterization of 35 novel α -L-iduronidase (IDUA) alleles / F. Bertola, M. Filocamo, G. Casati [et al.] // *Hum. Mutat.* – 2011 – Vol. 32, no. 6. – Pp. E2189–2190. DOI: 10.1002/humu.21479
138. Besouw, M. Growth retardation in children with cystinosis / M. Besouw, E. Levtschenko // *Minerva Pediatr.* – 2010. – Vol. 62, no. 3. – Pp. 307–314.
139. Besouw, M.T. Fertility status in male cystinosis patients treated with cysteamine / M.T. Besouw, J.A. Kremer, M.C. Janssen, E.N. Levtschenko // *Fertil. Steril.* – 2010. – Vol. 93, no. 6. – Pp. 1880–1883. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2008.12.113
140. Besouw, M.T. Management dilemmas in pediatric nephrology: Cystinosis / M.T. Besouw, M. van Dyck, D. Cassiman [et al.] // *Pediatr. Nephrol.* – 2015. – Vol. 30, no. 8. – 13 p. DOI:10.1007/s00467-015-3117-3.
141. Betend, B. Treatment of rickets caused by infantile cystinosis using 1 alpha-hydroxy vitamin D / B. Betend, P. Chatelain, L. David, R. François // *Arch. Fr. Pediatr.* – 1982. – Vol. 39, no. 8. – Pp. 615–618.
142. Beutler, E. Erroneous assignment of Gaucher disease genotype as a consequence of a complete gene deletion / E. Beutler, T. Gelbart // *Hum. Mutat.* – 1994. – Vol. 4, no. 3. – Pp. 212–216. DOI: 10.1002/humu.1380040307
143. Beutler, E. Gaucher disease / E. Beutler, G.A. Grabowski // *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* / C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly [et al.] (Eds.). – 4 vol. set. – 8th ed. – New York: McGraw-Hill, 2001. – Pp. 3635–3668.
144. Beutler, E. Gaucher disease: new molecular approaches to diagnosis and treatment / E. Beutler // *Science*. – 1992. – Vol. 256, no. 5058. – Pp. 794–799. DOI: 10.1126/science.1589760



145. Beutler, E. Gaucher's disease in an asymptomatic 72-year-old / E. Beutler // *JAMA*. – 1977. – Vol. 237, no. 23. – P. 2529.
146. Beutler, E. Identification of six new Gaucher disease mutations / E. Beutler, T. Gelbart, C. West // *Genomics*. – 1993. – Vol. 15, no. 1. – Pp. 203–205. DOI: 10.1006/geno.1993.1035
147. Bhatia, N. Isolated noncompaction of the left ventricular myocardium in adults: a systematic overview / N. Bhatia, A. Tajik, S. Wilansky [et al.] // *J. Card. Fail.* – 2011. – Vol. 17, no. 9. – Pp. 771–778. DOI: 10.1016/j.cardfail.2011.05.002
148. Bie, H. Insights into mucopolysaccharidosis I from the structure and action of α -L-iduronidase / H. Bie, J. Yin, X. He [et al.] // *Nat. Chem. Biol.* – 2013. – Vol. 9, no. 11. – Pp. 739–745. DOI: 10.1038/nchembio.1357
149. Biegstraaten, M. Recommendations for initiation and cessation of enzyme replacement therapy in patients with Fabry disease: The european Fabry working group consensus document / M. Biegstraaten, R. Arngrimsson, F. Barbey [et al.] // *Orphanet J. Rare Dis.* – 2015. – No. 10, art. num. 36. – 10 p. DOI: 10.1186/s13023-015-0253-6
150. Bierzynska, A. Genomic and clinical profiling of a national nephrotic syndrome cohort advocates a precision medicine approach to disease management / A. Bierzynska, H.J. McCarthy, K. Soderquest[et al.] // *Kidney Int.* – 2017. – Vol. 91, no. 4. – Pp. 937–947. DOI: 10.1016/j.kint.2016.10.013
151. Bińczak-Kuleta, A. Retrospective mutational analysis of NPHS1, NPHS2, WT1 and LAMB2 in children with steroid-resistant focal segmental glomerulosclerosis – a single-centre experience / A. Bińczak-Kuleta, J. Rubik, M. Litwin [et al.] // *Bosn. J. Basic Med. Sci.* – 2014. – Vol. 14, no. 2. – Pp. 89–93. DOI: 10.17305/bjbm.2014.2270
152. Binswanger, E. Über die “Dysostosis multiplex” (Typus Hurler) und ihre Beziehungen zu anderen Konstitutionsanomalien / E. Binswanger, O. Ullrich // *Z. Kinderheilk.* – 1933. – No. 54. – Pp. 699–712. DOI: 10.1007/BF02251606
153. Bischoff, G. Zum klinischen bild der glykogen-speicherungs-krankheit (glykogenose) / G. Bischoff // *Z. Kinderheilkd.* – 1932. – No. 52. – Pp. 722–726. DOI: 10.1007/BF02248461
154. Bishop, D.F. Human alpha-galactosidase A: nucleotide sequence of a cDNA clone encoding the mature enzyme / D.F. Bishop, D.H. Calhoun, H.S. Bernstein [et al.] // *Proc. Nat. Acad. Sci.* – 1986. – No. 83. – Pp. 4859–4863. DOI: 10.1073/pnas.83.13.4859
155. Bishop, N. Risedronate in children with osteogenesis imperfecta: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial / N. Bishop, S. Adami, S.F. Ahmed [et al.] // *Lancet.* – 2013. – Vol. 382, no. 9902. – Pp. 1424–1432. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)61091-0
156. Blackburn, P.R. Silent Tyrosinemia Type I Without Elevated Tyrosine or Succinylacetone Associated with Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma / P.R. Blackburn, R.D. Hickey, R.A. Nace [et al.] // *Hum. Mut.* – 2016. – Vol. 37, no. 10. – Pp. 1097–1105. DOI: 10.1002/humu.23047
157. Bliksrud, Y.T. Fumarylacetoacetate inhibits the initial step of the base excision repair pathway: implication for the pathogenesis of tyrosinemia type I / Y.T. Bliksrud, A. Ellingsen, M. Bjørås // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2013. – Vol. 36, no. 5. – Pp. 773–778. DOI: 10.1007/s10545-012-9556-0
158. Bliksrud, Y.T. Hereditary tyrosinaemia type I in Norway: incidence and three novel small deletions in the fumarylacetoacetase gene / Y.T. Bliksrud, E. Brodtkorb, P.H. Backe [et al.] // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* – 2012. – Vol. 72, no. 5. – Pp. 369–373. DOI: 10.3109/00365513.2012.676210

159. Bliksrud, Y.T. Tyrosinaemia type I – de novo mutation in liver tissue suppressing an inborn splicing defect / Y.T. Bliksrud, E. Brodtkorb, P.A. Andresen [et al.] // *J. Mol. Med.* – 2005. – Vol. 83, no. 5. – Pp. 406–410. DOI: 10.1007/s00109-005-0648-2
160. Bodamer, O.A. Newborn Screening for Pompe Disease / O.A. Bodamer, C.R. Scott, R. Giugliani; Pompe Disease Newborn Screening Working Group // *Pediatrics.* – 2017. – Vol. 140 (Suppl 1). – Pp. S4–S13. DOI: 10.1542/peds.2016-0280C
161. Boelens, J.J. Current international perspectives on hematopoietic stem cell transplantation for inherited metabolic disorders / J.J. Boelens, V.K. Prasad, J. Tolar [et al.] // *Pediatr. Clin. North Am.* – 2010. – Vol. 57, no. 1. – Pp. 123–145. DOI: 10.1016/j.pcl.2009.11.004
162. Boelens, J.J. Risk Factor Analysis of Outcomes after Unrelated Cord Blood Transplantation in Patients with Hurler Syndrome / J.J. Boelens, V. Rocha, M. Aldenhoven [et al.]; EUROCORD, Inborn error Working Party of EBMT, Duke University // *Biol. Blood Marrow Transplant.* – 2009. – Vol. 15, no. 5. – Pp. 618–625. DOI: 10.1016/j.bbmt.2009.01.020
163. Boerkoel, C.F. Mutant chromatin remodeling protein SMARCA1 causes Schimke immuno-osseous dysplasia / C.F. Boerkoel, H. Takashima, J. John [et al.] // *Nat. Genet.* – 2002. – Vol. 30, no. 2. – Pp. 215–220. DOI: 10.1038/ng821
164. Bohlega, S. Gaucher disease with oculomotor apraxia and cardiovascular calcification (Gaucher type IIIC) / S. Bohlega, M. Kambouris, M. Shahid [et al.] // *Neurology.* – 2000. – Vol. 54, no. 1. – Pp. 261–263. DOI: 10.1212/wnl.54.1.261
165. Bonafe, L. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2015 revision / L. Bonafe, V. Cormier-Daire, C. Hall [et al.] // *Am. J. Med. Genet. A.* – 2015. – Vol. 167A, no. 12. – Pp. 2869–2892. DOI: 10.1002/ajmg.a.37365
166. Bondeson, M.L. Inversion of the IDS gene resulting from recombination with IDS-related sequences is a common cause of the Hunter syndrome / M.L. Bondeson, N. Dahl, H. Malmgren [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* – 1995. – Vol. 4, no. 4. – Pp. 615–621. DOI: 10.1093/hmg/4.4.615
167. Borges, F. Is focal segmental glomerulosclerosis increasing in patients with nephrotic syndrome? / F. Borges, L. Shiraichi, M. da Silva [et al.] // *Pediatr. Nephrol.* – 2007. – Vol. 22, no. 9. – Pp. 1307–1313. DOI: 10.1007/s00467-007-0516-0
168. Bos J. Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Implications of Genetic Testing for Hypertrophic Cardiomyopathy / J. Bos, J. Towbin, M. Ackerman // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2009. – Vol. 54, no. 3. – Pp. 201–211. DOI: 10.1016/j.jacc.2009.02.075
169. Bos, J.M. Genotype-phenotype relationships involving hypertrophic cardiomyopathy-associated mutations in titin, muscle LIM protein, and telethonin / J.M. Bos, R.N. Poley, M. Ny [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* – 2006. – Vol. 88, no. 1. – Pp. 78–85. DOI: 10.1016/j.ymgme.2005.10.008
170. Botto, L.D. Left ventricular noncompaction. Orphanet Encyclopedia / L.D. Botto. – 2004. – Available at: <https://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-LVNC.pdf>
171. Bouchireb, K. NPHS2 mutations in steroid-resistant nephrotic syndrome: a mutation update and the associated phenotypic spectrum / K. Bouchireb, O. Boyer, O. Gribouval [et al.] // *Hum. Mutat.* – 2014. – Vol. 35, no. 2. – Pp. 178–186. DOI: 10.1002/humu.22485
172. Boycott, K.M. International cooperation to enable the diagnosis of all rare genetic diseases / K.M. Boycott, A. Rath, J.X. Chong [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2017. – Vol. 100, no. 5. – Pp. 695–705. DOI: 10.1016/j.ajhg.2017.04.003

173. Boyer, O. Focal and segmental glomerulosclerosis in children: a longitudinal assessment / O. Boyer, J. Moulder, M. Somers // *Pediatr. Nephrol.* – 2007. – Vol. 22, no. 8. – Pp. 1159–1166. DOI: 10.1007/s00467-007-0493-3
174. Boyer, O. LMX1B mutations cause hereditary FSGS without extrarenal involvement / O. Boyer, S. Woerner, F. Yang [et al.] // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2013. – Vol. 24, no. 8. – Pp. 1216–1222. DOI: 10.1681/ASN.2013020171
175. Brady, R.O. Metabolism of Glucocerebrosides, II: Evidence of an Enzymatic Deficiency in Gaucher's Disease / R.O. Brady, J.N. Kanfer, D. Shapiro // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1965. – Vol. 18, no. 2. – Pp. 221–225. DOI: 10.1016/0006-291x(65)90743-6
176. Brante, G. Gargoylism: a mucopolysaccharidosis / G. Brante // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* – 1952. – No. 4. – Pp. 43–46.
177. Branton, M.H. Natural history of Fabry renal disease: influence of alpha-galactosidase A activity and genetic mutations on clinical course / M.H. Branton, R. Schiffmann, S.G. Sabnis [et al.] // *Medicine (Baltimore).* – 2002. – Vol. 81, no. 2. – Pp. 122–138. DOI: 10.1097/00005792-200203000-00003
178. Braun, D.A. Mutations in nuclear pore genes NUP93, NUP205 and XPO5 cause steroid-resistant nephrotic syndrome / D.A. Braun, C.E. Sadowski, S. Kohl [et al.] // *Nat. Genet.* – 2016. – Vol. 48, no. 4. – Pp. 457–465. DOI: 10.1038/ng.3512
179. Brent, L. Familial muscular subaortic stenosis: an unrecognized form of “idiopathic heart disease”, with clinical and autopsy observations / L. Brent, A. Aburano, D. Fisher [et al.] // *Circulation.* – 1960. – No. 21. – Pp. 167–180. DOI: 10.1161/01.cir.21.2.167
180. Bright, R. Reports of Medical Cases, selected with a view of illustrating the symptoms and cure of diseases by a reference to morbid anatomy / R. Bright. – London: Richard Taylor for Longman, Rees, Orme, Brown, and Green, 1827.
181. Brizi, M.G. Successful treatment of tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome with canakinumab / M.G. Brizi, M. Galeazzi, O.M. Lucherini [et al.] // *Ann. Intern. Med.* – 2012. – Vol. 156, no. 12. – Pp. 907–908. DOI: 10.7326/0003-4819-156-12-201206190-00027
182. Brizola, E. Clinical features and pattern of fractures at the time of diagnosis of osteogenesis imperfecta in children / E. Brizola, M. Zambrano, B. Pinheiro [et al.] // *Rev. Paul. Pediatr.* – 2017. – Vol. 35, no. 2. – Pp. 171–177. DOI: 10.1590/1984-0462/2017;35;2;00001
183. Brodin-Sartorius, A. Cysteamine therapy delays the progression of nephropathic cystinosis in late adolescents and adults / A. Brodin-Sartorius, M.J. Tête, P. Niaudet [et al.] // *Kidney Int.* – 2012. – Vol. 81, no. 2. – Pp. 179–89. DOI: 10.1038/ki.2011.277
184. Brouns, R. Belgian Fabry study: prevalence of Fabry disease in a cohort of 1000 young patients with cerebrovascular disease / R. Brouns, V. Thijs, F. Eyskens [et al.] // *Stroke.* – 2010. – Vol. 41, no. 5. – Pp. 863–868. DOI: 10.1161/strokeaha.110.579409
185. Brown, B.I. Lack of an alpha-1,4-glucan: alpha-1,4-glucan 6-glycosyl transferase in a case of type IV glycogenosis / B.I. Brown, D.H. Brown // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1966. Vol. 56, no. 2. – Pp. 725–729. DOI: 10.1073/pnas.56.2.725
186. Brown, E.J. Genetic testing for nephrotic syndrome and FSGS in the era of next-generation sequencing / E.J. Brown, M.R. Pollak, M. Barua // *Kidney Int.* – 2014. – Vol. 85, no. 5. – Pp. 1030–1038. DOI: 10.1038/ki.2014.48

187. Brun F, Barnes C., Sinagra G., et al. Titin and desmosomal genes in the natural history of arrhythmic right ventricular cardiomyopathy. // *J of Med Genet.* 2014; 51(10): 669-76.
188. Bruno, C. Clinical and genetic heterogeneity of branching enzyme deficiency (glycogenosis type IV) / C. Bruno, O.P. van Diggelen, D. Cassandrini [et al.] // *Neurology.* – 2004. Vol. 63, no. 6. – Pp. 1053–1058. DOI: 10.1212/01.wnl.0000138429.11433.0d
189. Brushia, R.J. Phosphorylase kinase: the complexity of its regulation is reflected in the complexity of its structure / R.J. Brushia, D.A. Walsh // *Front. Biosci.* – 1999. – No. 4. – Pp. d618–641. DOI: 10.2741/brushia
190. Brusius-Facchin A.C., Severe phenotype in MPS II patients associated with a large deletion including contiguous genes / A.C. Brusius-Facchin, C.F. De Souza, I.V. Schwartz [et al.] // *Am. J. Med. Genet. A.* – 2012. – Vol. 158A, no. 5. – Pp. 1055–1059. DOI: 10.1002/ajmg.a.35271
191. Buday, K. Beiträge zur Lehre von der Osteogenesis imperfecta / K. Buday. – Berlin, 1895.
192. Bunge, S. Mucopolysaccharidosis type I: identification of 8 novel mutations and determination of the frequency of the two common alpha-L-iduronidase mutations (W402X and Q70X) among European patients / S. Bunge, W.J. Kleijer, C. Steglich [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* – 1994. – Vol. 3, no. 6. – Pp. 861–866. DOI: 10.1093/hmg/3.6.861
193. Burrow, T.A. Non-lethal congenital hypotonia due to glycogen storage disease type IV / T.A. Burrow, R.J. Hopkin, K.E. Bove [et al.] // *Am. J. Med. Genet. A.* – 2006. – Vol. 140, no. 8. – Pp. 878–882. DOI: 10.1002/ajmg.a.31166
194. Burwinkel, B. Autosomal glycogenosis of liver and muscle due to phosphorylase kinase deficiency is caused by mutations in the phosphorylase kinase beta subunit (PHKB) / B. Burwinkel, A.J. Maichele, O. Aagenaes [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* – 1997. – Vol. 6, no. 7. – Pp. 1109–1115. DOI: 10.1093/hmg/6.7.1109
195. Burwinkel, B. Liver glycogenosis due to phosphorylase kinase deficiency: PHKG2 gene structure and mutations associated with cirrhosis / B. Burwinkel, S. Shiomi, A. Al Zaben, M.W. Kilimann // *Hum. Mol. Genet.* – 1998. – Vol. 7, no. 1. – Pp. 149–154. DOI: 10.1093/hmg/7.1.149
196. Burwinkel, B. Muscle glycogenosis with low phosphorylase kinase activity: mutations in PHKA1, PHKG1 or six other candidate genes explain only a minority of cases / B. Burwinkel, B. Hu, A. Schroers [et al.] // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2003. – Vol. 11, no. 7. – Pp. 516–526. DOI: 10.1038/sj.ejhg.5200996
197. Burwinkel, B. Mutation hotspots in the PHKA2 gene in X-linked liver glycogenosis due to phosphorylase kinase deficiency with atypical activity in blood cells (XLG2) / B. Burwinkel, Y.S. Shin, H.D. Bakker [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* – 1996. – Vol. 5, no. 5. – Pp. 653–658. DOI: 10.1093/hmg/5.5.653
198. Büscher, A.K. Immunosuppression and renal outcome in congenital and pediatric steroid-resistant nephrotic syndrome / A.K. Büscher, B. Kranz, R. Büscher [et al.] // *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* – 2010. – Vol. 5, no. 11. – Pp. 2075–2084. DOI: 10.2215/CJN.01190210
199. Büscher, A.K. Rapid Response to cyclosporin A and favorable renal outcome in nongenetic versus genetic steroid-resistant nephrotic syndrome / A.K. Büscher, B.B. Beck, A. Melk [et al.]; German Pediatric Nephrology Association (GPN) // *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* – 2016. – Vol. 11, no. 2. – Pp. 245–253. DOI: 10.2215/CJN.07370715

200. Byers, P.H. Ehlers-Danlos syndrome type VIIA and VIIB result from splice-junction mutations or genomic deletions that involve exon 6 in the COL1A1 and COL1A2 genes of type I collagen / P.H. Byers, M. Duvic, M. Atkinson [et al.] // *Am. J. Med. Genet.* – 1997. – Vol. 72, no. 1. – Pp. 94–105.
DOI: 10.1002/(sici)1096-8628(19971003)72:1<94::aid-ajmg20>3.0.co;2-o
201. Byers, P.H. Osteogenesis imperfecta: translation of mutation to phenotype / P.H. Byers, G.A. Wallis, M.C. Willing // *J. Med. Genet.* – 1991. – Vol. 28, no. 7. – Pp. 433–442.
DOI: 10.1136/jmg.28.7.433
202. Byrne, B.J. Pompe disease: design, methodology, and early findings from the Pompe Registry / B.J. Byrne, P.S. Kishnani, L.E. Case [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* – 2011. – Vol. 103, no. 1. – Pp. 1–11. DOI: 10.1016/j.ymgme.2011.02.004
203. Cabral, W.A. A founder mutation in LEPRE1 carried by 1.5% of West Africans and 0.4% of African Americans causes lethal recessive osteogenesis imperfect / W.A. Cabral, A.M. Barnes, A. Adeyemo [et al.] // *Genet. Med.* – 2012. – Vol. 14, no. 5. – Pp. 543–551.
DOI: 10.1038/gim.2011.44
204. Cabral, W.A. Mutations near amino end of alpha1(I) collagen cause combined osteogenesis imperfecta/Ehlers-Danlos syndrome by interference with N-propeptide processing / W.A. Cabral, E. Makareeva, A. Colige [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280, no. 19. – Pp. 19259–19269. DOI: 10.1074/jbc.M414698200
205. Cabral, W.A. Prolyl 3-hydroxylase 1 deficiency causes a recessive metabolic bone disorder resembling lethal/severe osteogenesis imperfect / W.A. Cabral, W. Chang, A.M. Barnes [et al.] // *Nat. Genet.* – 2007. – Vol. 39, no. 3. – Pp. 359–365.
DOI: 10.1038/ng1968
206. Cahill, T.J. Genetic cardiomyopathies causing heart failure / T.J. Cahill, H. Ashrafian, H. Watkins // *Circ. Res.* – 2013. – Vol. 113, no. 6. – Pp. 660–675.
DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.113.300282
207. Capotondo, A. Brain conditioning is instrumental for successful microglia reconstitution following hematopoietic stem cell transplantation / A. Capotondo, R. Milazzo, L.S. Politi [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2012. – Vol. 109, no. 37. – Pp. 15018–15023.
DOI: 10.1073/pnas.1205858109
208. Carniel, E. Alpha-myosin heavy chain: a sarcomeric gene associated with dilated and hypertrophic phenotypes of cardiomyopathy / E. Carniel, M.R. Taylor, G. Sinagra [et al.] // *Circulation.* – 2005. – Vol. 112, no. 1. – Pp. 54–59.
DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.507699
209. Carvalho, P.M. Glycogen Storage Disease type 1a – a secondary cause for hyperlipidemia: report of five cases / P.M. Carvalho, N.J. Silva, P.G. Dias [et al.] // *J. Diabetes Metab. Disord.* – 2013. – Vol. 12, no. 1. – P. 25. DOI: 10.1186/2251-6581-12-25
210. Case, L.E. Infantile Pompe disease on ERT: update on clinical presentation, musculoskeletal management, and exercise considerations / L.E. Case, A.A. Beckemeyer, P.S. Kishnani // *Am. J. Med. Genet. C: Semin. Med. Genet.* – 2012. – Vol. 160 C, no. 1. – Pp. 69–79. DOI: 10.1002/ajmg.c.31321
211. Cassiman, D. A novel mutation causing mild, atypical fumarylacetoacetase deficiency (Tyrosinemia type I): a case report / D. Cassiman, R. Zeevaert, E. Holme [et al.] // *Orphanet J. Rare Dis.* – 2009. – No. 4, art. num. 28. – 6 p. DOI: 10.1186/1750-1172-4-28

212. Cattran, D.C. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Glomerulonephritis Work Group. KDIGO clinical practice guideline for glomerulonephritis / D.C. Cattran, J. Feehally, H.T. Cook [et al.] // *Kidney Int. Suppl.* 2012. Vol. 2, no. 2. Pp. 139–274.
213. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Good laboratory practices for biochemical genetic testing and newborn screening for inherited metabolic disorders // *MMWR Recomm. Rep.* – 2012. – Vol. 61, no. RR–2. – Pp. 1–44. – Available at: <https://www.cdc.gov/mmwr/pdf/rr/rr6102.pdf>.
214. Chabas, A. Unusual expression of Gaucher's disease: cardiovascular calcifications in three sibs homozygous for the D409H mutation / A. Chabas, B. Cormand, D. Grinberg [et al.] // *J. Med. Genet.* – 1995. – Vol. 32, no. 9. – Pp. 740–742. DOI: 10.1136/jmg.32.9.740
215. Chabli, A. Measurement of cystine in granulocytes using liquid chromatography-tandem mass spectrometry / A. Chabli, J. Aupetit, M. Raehm [et al.] // *Clin. Biochem.* – 2007. – Vol. 40, no. 9–10. – Pp. 692–698. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2007.02.005
216. Chadwick, J. The medical works of Hippocrates : a new translation from the original Greek made especially for English readers / John Chadwick, William Neville Mann. – Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1950. – 301 p.
217. Chamoles, N.A. Diagnosis of alpha-L-iduronidase deficiency in dried blood spots on filter paper: the possibility of newborn diagnosis / N.A. Chamoles, M. Blanco, D. Gaggioli // *Clin. Chem.* – 2001. – Vol. 47, no. 4. – Pp. 780–781. DOI: 10.1093/clinchem/47.4.780
218. Chamoles, N.A. Gaucher and Niemann-Pick diseases--enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper: retrospective diagnoses in newborn-screening cards / N.A. Chamoles, M. Blanco, D. Gaggioli, C. Casentini // *Clin. Chim. Acta.* – 2002. – Vol. 317, no. 1–2. – Pp. 191–197. DOI: 10.1016/s0009-8981(01)00798-7
219. Chamoles, N.A. Tay-Sachs and Sandhoff diseases: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper: retrospective diagnoses in newborn-screening cards / N.A. Chamoles, M. Blanco, D. Gaggioli, C. Casentini // *Clin. Chim. Acta.* – 2002. – Vol. 318, no. 1–2. – Pp. 133–137. DOI: 10.1016/s0009-8981(02)00002-5
220. Chang, S. Identification of a mutation in liver glycogen phosphorylase in glycogen storage disease type VI / S. Chang, M.J. Rosenberg, H. Morton [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* – 1998. – Vol. 7, no. 5. – Pp. 865–870. DOI: 10.1093/hmg/7.5.865
221. Chen, C.P. Prenatal diagnosis of recurrent autosomal dominant osteogenesis imperfecta associated with unaffected parents and paternal gonadal mosaicism / C.P. Chen, S.P. Lin, Y.N. Su [et al.] // *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.* – 2013. – Vol. 52, no. 1. – Pp. 106–109. DOI: 10.1016/j.tjog.2013.01.013
222. Chen, M.A. Glycogen storage diseases: Diagnosis, treatment and outcome / M.A. Chen, D.A. Weinstein // *Transl. Sci. Rare Dis.* – 2016. – Vol. 1, no. 1. – Pp. 45–72. DOI: 10.3233/TRD-160006
223. Chen, X. Clinical and molecular characterization of infantile-onset Pompe disease in Mainland Chinese patients: identification of two common mutations / X. Chen, T. Liu, M. Huang [et al.] // *Genet. Test. Mol. Biomarkers.* – 2017. – Vol. 21, no. 6. – Pp. 391–396. DOI: 10.1089/gtmb.2016.0424
224. Chen, Y.T. Glycogen storage disease / Y.T. Chen // *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* / C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly [et al.] (Eds.). – 4 vol. set. – 8th ed. – New York: McGraw-Hill, 2001. – Pp. 1521–1551.

225. Cherif, W. High frequency of W1327X mutation in glycogen storage disease type III patients from central Tunisia / W. Cherif, F. Ben Rhouma, H. Messai [et al.] // *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. – 2012. – Vol. 70, no. 6. – Pp. 648–650. DOI: 10.1684/abc.2012.0766
226. Chernin, G. Genotype/phenotype correlation in nephrotic syndrome caused by WT1 mutations / G. Chernin, V. Vega-Warner, D.S. Schoeb [et al.] // *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* – 2010. – Vol. 5, no. 9. – Pp. 1655–1662. DOI: 10.2215/CJN.09351209
227. Chiavérini, C. In vivo reflectance confocal microscopy of the skin: a noninvasive means of assessing body cystine accumulation in infantile cystinosis / C. Chiavérini, H.Y. Kang, L. Sillard [et al.] // *J. Am. Acad. Dermatol.* – 2013. – Vol. 68, no. 4. – Pp. e111–116. DOI: 10.1016/j.jaad.2011.08.010
228. Chien, Y.H. Early pathologic changes and responses to treatment in patients with later-onset Pompe disease / Y.H. Chien, N.C. Lee, P.H. Huang [et al.] // *Pediatr. Neurol.* – 2012. – Vol. 46, no. 3. – Pp. 168–171. DOI: 10.1016/j.pediatrneurol.2011.12.010
229. Chien, Y.H. Lyso-globotriaosylsphingosine (lyso-Gb3) levels in neonates and adults with the Fabry disease later-onset GLA IVS4+919G>A mutation / Y.H. Chien, O.A. Bodamer, S.C. Chiang [et al.] // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2013. – Vol. 36, no. 5. – Pp. 881–885. DOI: 10.1007/s10545-012-9547-1
230. 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'ANov [et al.] // *J. Genet. Genomics.* – 2014. – Vol. 41, no. 4. – Pp. 197–203. DOI: 10.1016/j.jgg.2014.01.007
231. Chistiakov, D.A. Genetic background of juvenile idiopathic arthritis / D.A. Chistiakov, K.V. Savost'ANov, A.A. Baranov // *Autoimmunity.* – 2014. – Vol. 47, no. 6. – Pp. 351–360.
232. Chistiakov, D.A. Molecular characteristics of patients with glycosaminoglycan storage disorders in Russia / D.A. Chistiakov, K.V. Savost'ANov, A.A. Pushkov [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* – 2014. – Vol. 436. Pp. 112–120. DOI: 10.1016/j.cca.2014.05.010
233. Chiu, C. Genetic screening of calcium regulation genes in familial hypertrophic cardiomyopathy / C. Chiu, M. Tebo, J. Ingles [et al.] // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2007. – Vol. 43, no. 3. – Pp. 337–343. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2007.06.009
234. Chkioua, L. Mucopolysaccharidosis type I: molecular characteristics of two novel alpha-L-iduronidase mutations in Tunisian patients / L. Chkioua, S. Khedhiri, H.B. Turkia [et al.] // *Diagn. Pathol.* – 2011. – No. 6. – Pp. 47–50. DOI: 10.1186/1746-1596-6-47
235. Chmielarz, I. Comparison of siRNA- mediated silencing of glycosaminoglycan synthesis genes and enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis in cell culture studies / I. Chmielarz, M. Gabig-Ciminska, M. Malinowska [et al.] // *Acta Biochim. Pol.* – 2012. – Vol. 59, no. 4. – Pp. 697–702. DOI: 10.18388/abp.2012_2113
236. Cho, S.Y. Osteogenesis imperfecta type VI with severe bony deformities caused by novel compound heterozygous mutations in SERPINF1 / S.Y. Cho, C.S. Ki, Y.B. Sohn [et al.] // *J. Korean Med. Sci.* – 2013. – Vol. 28, no. 7. – Pp. 1107–1110. DOI: 10.3346/jkms.2013.28.7.1107
237. Cho, S.Y. X-linked glycogen storage disease IXa manifested in a female carrier due to skewed X chromosome inactivation / S.Y. Cho, Ch.-W. Lam, S.-F. Tong, W.-K. Siu // *Clin. Chim. Acta.* – 2013. – No. 426. – Pp. 75–78. DOI: 10.1016/j.cca.2013.08.026

238. Cho, T.-J. A single recurrent mutation in the 5'-UTR of IFITM5 causes osteogenesis imperfecta type V / T.-J. Cho, K.-E. Lee, S.-K. Lee [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2012. – Vol. 91, no. 2. – Pp. 343–348. DOI: 10.1016/j.ajhg.2012.06.005
239. Chong, J.X. The genetic basis of mendelian phenotypes: discoveries, challenges, and opportunities / J.X. Chong, K.J. Buckingham, S.N. Jhangiani [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2015. – Vol. 97, no. 2. – Pp. 199–215. DOI: 10.1016/j.ajhg.2015.06.009
240. Chou, J.Y. Molecular genetics of type 1 glycogen storage diseases / J.Y. Chou, B.C. Mansfield // *Trends Endocrinol. Metab.* – 1999. – Vol. 10, no. 3. – Pp. 104–113. DOI: 10.1016/s1043-2760(98)00123-4
241. Chou, J.Y. Mutations in the glucose-6-phosphatase-alpha (G6PC) gene that cause type Ia glycogen storage disease / J.Y. Chou, B.C. Mansfield // *Hum. Mutat.* – 2008. – Vol. 29, no. 7. – Pp. 921–930. DOI: 10.1002/humu.20772
242. Chou, J.Y. Neutropenia in type Ib glycogen storage disease / J.Y. Chou, H.S. Jun, B.C. Mansfield // *Curr. Opin. Hematol.* – 2010. – Vol. 17, no. 1. – Pp. 36–42. DOI: 10.1097/MOH.0b013e328331df85
243. Chou, J.Y. Type 1 glycogen storage diseases: disorders of the glucose-6-phosphatase complex / J.Y. Chou, D. Matern, B.C. Mansfield, Y.-T. Chen // *Curr. Mol. Med.* – 2002. – Vol. 2, no. 2. – Pp. 121–143. DOI: 10.2174/1566524024605798
244. Choy, F. Novel point mutation (W184R) in neonatal type 2 Gaucher disease / F. Choy, K. Wong, H. Vallance, V. Baldwin // *Pediatr. Dev. Pathol.* – 2000. – Vol. 3, no. 2. – Pp. 180–183. DOI: 10.1007/s100240050023
245. Christiansen, H.E. Homozygosity for a missense mutation in SERPINH1, which encodes the collagen chaperone protein HSP47, results in severe recessive osteogenesis imperfect / H.E. Christiansen, U. Schwarze, S.M. Pyott [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2010. – Vol. 86, no. 3. – Pp. 389–398. DOI: 10.1016/j.ajhg.2010.01.034
246. Chuang, C.-K. Status of newborn screening and follow up investigations for Mucopolysaccharidoses I and II in Taiwan / C.-K. Chuang, H.-Y. Lin, T.-J. Wang [et al.] // *Orphanet J. Rare Dis.* – 2018. – Vol. 13, no. 1, art. num. 84. – 14 p. DOI: 10.1186/s13023-018-0816-4.
247. Cil, O. Monogenic causes of proteinuria in children / O. Cil, F. Perwad // *Front. Med (Lausanne).* – 2018. – No. 5. – P. 55. DOI: 10.3389/fmed.2018.00055
248. Citro, V. Identification of an allosteric binding site on human lysosomal alpha-galactosidase opens the way to new pharmacological chaperones for Fabry disease / V. Citro, J. Peña-García, H. den-Haan [et al.] // *PLoS ONE.* – 2016. – Vol. 11, no. 10, e0165463. – 15 p. DOI: 10.1371/journal.pone.0165463
249. Clarke, J.T. Hunter disease (mucopolysaccharidosis type II) in a karyotypically normal girl / J.T. Clarke, H.F. Willard, I. Teshima [et al.] // *Clin. Genet.* – 1990. – Vol. 37, no. 5. – Pp. 355–362. DOI: 10.1111/j.1399-0004.1990.tb03519.x
250. Clarke, J. T.R. Narrative review: Fabry disease / J.T. R. Clarke // *Ann. Intern. Med.* – 2007. – Vol. 146, no. 6. – Pp. 425–433. DOI: 10.7326/0003-4819-146-6-200703200-00007
251. Clarke, L.A. Long-term efficacy and safety of laronidase in the treatment of mucopolysaccharidosis I / L.A. Clarke, J.E. Wraith, M. Beck [et al.] // *Pediatrics.* – 2009. – Vol. 123, no. 1. – Pp. 229–240. DOI: 10.1542/peds.2007-3847

252. Clarke, L.A. Mucopolysaccharidosis Type I / L.A. Clarke // GeneReviews® [Internet] / M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon [et al.] (Eds.). – Seattle (WA): University of Washington, 1993–2020. – 2002 [updated Feb 11, 2016]. – Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1162/>.
253. Clarke, L.A. Mucopolysaccharidosis type I newborn screening: best practices for diagnosis and management / L.A. Clarke, A.M. Atherton, B.K. Burton [et al.] // *J. Pediatr.* – 2017. – No. 182. Pp. 363–370. DOI: 10.1016/j.jpeds.2016.11.036
254. Coats, C.J. Hypertrophic cardiomyopathy: lessons from history / C.J. Coats, A. Hollman // *Heart.* – 2008. – Vol. 94, no. 10. – Pp. 1258–1263. DOI: 10.1136/hrt.2008.153452
255. Codd, M.B. Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy. A population-based study in Olmsted County, Minnesota, 1975–1984 / M.B. Codd, D.D. Sugrue, B.J. Gersh, L.J. Melton 3rd // *Circulation.* – 1989. – Vol. 80, no. 3. – Pp. 564–72. DOI: 10.1161/01.cir.80.3.564
256. Cole, W.G. The Nicholas Andry Award-1996. The Molecular Pathology of Osteogenesis Imperfecta / W.G. Cole // *Clin. Orthop. Relat. Res.* – 1997. – No. 343. – Pp. 235–248.
257. Cori, G. T. Enzymes and glycogenstructure in glycogenosis / G.T. Cori // *Osterr. Z. Kinderheilkd. Kinderfuersorge.* – 1954. – Vol. 10, no. 1–2. – Pp. 38–42.
258. Cori, G.T. Glucose-6-phosphatase of the liver in glycogen storage disease / G.T. Cori, C.F. Cori // *J. Biol. Chem.* – 1952. – Vol. 199, no. 2. – Pp. 661–667.
259. Cormand, B. Gaucher disease in Spanish patients: Analysis of eight mutations / B. Cormand, L. Vilageliu, J.M. Burguera [et al.] // *Hum. Mutat.* – 1995. – Vol. 5, no. 4. – Pp. 303–309. DOI: 10.1002/humu.1380050406
260. Cormand, B. Mutation analysis of Gaucher disease patients from Argentina: high prevalence of the RecNciI mutation / B. Cormand, T.L. Harboe, L. Gort [et al.] // *Am. J. Med. Genet.* – 1998. – Vol. 80, no. 4. – Pp. 343–351. DOI: 10.1002/(sici)1096-8628(19981204)80:4<343::aid-ajmg8>3.0.co;2-w
261. Corrado, D. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: an update / D. Corrado, C. Basso, G. Thiene // *Heart.* – 2009. – Vol. 95, no. 9. – Pp. 766–773. DOI: 10.1136/hrt.2008.149823
262. Corrado, D. Spectrum of clinicopathologic manifestations of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: a multicenter study / D. Corrado, C. Basso, G. Thiene [et al.] // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 1997. – Vol. 30, no. 6. – Pp. 1512–1520. DOI: 10.1016/s0735-1097(97)00332-x
263. Correia, C.E. Use of modified cornstarch therapy to extend fasting in glycogen storage disease types Ia and Ib / C.E. Correia, K. Bhattacharya, P.J. Lee [et al.] // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2008. – Vol. 88, no. 5. – Pp. 1272–1276. DOI: 10.3945/ajcn.2008.26352
264. Corti, M. Evaluation of readministration of a recombinant adeno-associated virus vector expressing acid alpha-glycosidase in Pompe disease: preclinical to clinical planning / M. Corti, B. Cleaver, N. Clément [et al.] // *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.*–2015. – Vol. 26, no. 3. – Pp. 185–193. DOI: 10.1089/humc.2015.068
265. Couce, M.L. Tyrosinemia type 1 in Spain: mutational analysis, treatment and long-term outcome / M.L. Couce, J. Dalmau, M. del Toro [et al.] // *Pediatr. Int.* – 2011. – Vol. 53, no. 6. – Pp. 985–989. DOI: 10.1111/j.1442-200X.2011.03427.x

266. Cozar, M. Molecular characterization of a new deletion of the GBA1 gene due to an inter Alu recombination event / M. Cozar, B. Bembi, S. Dominissini [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* – 2011. – Vol. 102, no. 2. – Pp. 226–228. DOI: 10.1016/j.ymgme.2010.10.004
267. Crerar, M.M. Chimeric muscle and brain glycogen phosphorylases define protein domains governing isozyme-specific responses to allosteric activation / M.M. Crerar, O. Karlsson, R. J. Fletterick [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1995. – No. 270. – Pp. 13748–13756. DOI: 10.1074/jbc.270.23.13748
268. Cunningham, M. Hearing assessment in infants and children: recommendations beyond neonatal screening / M. Cunningham, E.O. Cox; Committee on practice and ambulatory medicine, Section on otolaryngology and bronchoesophagology // *Pediatrics.* – 2003. – Vol. 111, no. 2. – Pp. 436–440. DOI: 10.1542/peds.111.2.436
269. D'Aco, K. Diagnosis and treatment trends in mucopolysaccharidosis I: findings from the MPS I Registry / K. D'Aco, L. Underhill, L. Rangachari [et al.] // *Eur. J. Pediatr.* – 2012. – Vol. 171, no. 6. – Pp. 911–919. DOI: 10.1007/s00431-011-1644-x
270. Dagli, A.I. Glycogen storage disease type VI / A.I. Dagli, E. Labrador, D.A. Weinstein // *GeneReviews*[®] [Internet] / M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon [et al.] (Eds.). – Seattle (WA): University of Washington, 1993–2020. – 2009 [updated Nov 27, 2019]. – Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5941/>.
271. Dahl, N. Gaucher disease type III (Norrbotnian type) is caused by a single mutation in exon 10 of the glucocerebrosidase gene / N. Dahl, M. Lagerström, A. Erikson, U. Pettersson // *Am. J. Hum. Genet.* – 1990. – Vol. 47, no. 2. – Pp. 275–278. – Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1683716/>.
272. Dalakas, M.C. Desmin Myopathy, a Skeletal Myopathy with Cardiomyopathy Caused by Mutations in the Desmin Gene / M.C. Dalakas, K.-Y. Park, C. Semino-Mora [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2000. – Vol. 342, no. 11. – Pp. 770–780. DOI: 10.1056/NEJM200003163421104
273. Dandana, A. Gaucher disease: clinical, biological and therapeutic aspects / A. Dandana, S. Ben Khelifa, H. Chahed [et al.] // *Pathobiology.* – 2016. – Vol. 83, no. 1. – Pp. 13–23. DOI: 10.1159/000440865
274. Das, A.M. Glycogen storage disease type 1: impact of medium-chain triglycerides on metabolic control and growth / A.M. Das, T. Lücke, U. Meyer [et al.] // *Ann. Nutr. Metab.* – 2010. – Vol. 56, no. 3. – Pp. 225–232. DOI: 10.1159/000283242
275. David, E.S. Quantitation of muscle glycogen phosphorylase mRNA and enzyme amounts in adult rat tissues / E.S. David, M.M. Crerar // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1986. – No. 880(1). – Pp. 78–90. DOI: 10.1016/0304-4165(86)90122-4
276. Davies, J.P. Mutation analysis in patients with the typical form of Anderson-Fabry disease / J.P. Davies, B.G. Winchester, S. Malcolm // *Hum. Mol. Genet.* – 1993. – Vol. 2, no. 7. – Pp. 1051–1053. DOI: 10.1093/hmg/2.7.1051
277. Davis, M.K. Liver transplantation in children with glycogen storage disease: controversies and evaluation of the risk/benefit of this procedure / M.K. Davis, D.A. Weinstein // *Pediatr. Transplant.* – 2008. – Vol. 12, no. 2. – Pp. 137–145. DOI: 10.1111/j.1399-3046.2007.00803.x
278. Davit-Spraul, A. Liver glycogen storage diseases due to phosphorylase system deficiencies: diagnosis thanks to non invasive blood enzymatic and molecular studies / A. Davit-Spraul, M. Piraud, D. Dobbelaere [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* – 2011. – Vol. 104, no. 1–2. – Pp. 137–143. DOI: 10.1016/j.ymgme.2011.05.010

279. De Alencar, D.O. Fabry disease: Evidence for a regional founder effect of the GLA gene mutation 30delG in Brazilian patients / D.O. De Alencar, C. Netto, P. Ashton-Prolla [et al.] // *Mol. Genet. Metab. Rep.* – 2014. – No. 1. – Pp. 414–421. DOI: 10.1016/j.ymgmr.2014.09.002
280. De Jesus, V.R. Development and evaluation of quality control dried blood spot materials in newborn screening for lysosomal storage disorders / V.R. De Jesus, X.K. Zhang, J. Keutzer [et al.] // *Clin. Chem.* – 2009. – Vol. 55, no. 1. – Pp. 158–164. DOI: 10.1373/clinchem.2008.111864
281. De Ru, M.H. Enzyme replacement therapy and/or hematopoietic stem cell transplantation at diagnosis in patients with mucopolysaccharidosis type I: results of a European consensus procedure / M.H. De Ru, J.J. Boelens, A.M. Das [et al.] // *Orphanet J. Rare Dis.* – 2011. – No. 68, art. num. 55. – 9 p. DOI: 10.1186/1750-1172-6-55
282. De Ruijter, J. Mucopolysaccharidosis type III (Sanfilippo Syndrome): emerging treatment strategies / J. De Ruijter, M.J. Valstar, F.A. Wijburg // *Curr. Pharm. Biotechnol.* – 2011. – Vol. 12, no. 6. – Pp. 923–930. DOI: 10.2174/138920111795542651
283. De Filippi, P. Genotype-phenotype correlation in Pompe disease, a step forward / P. De Filippi, K. Saeidi, S. Ravaglia [et al.] // *Orphanet J. Rare Dis.* – 2014. – No. 9, art. num. 102. – 11 p. DOI: 10.1186/s13023-014-0102-z
284. De Laet, C. Recommendations for the management of tyrosinaemia type 1 / C. De Laet, C. Dionisi-Vici, J.V. Leonard [et al.] // *Orphanet J. Rare Dis.* – 2013. – No. 8, art. num. 8. – 9 p. DOI: 10.1186/1750-1172-8-8
285. De Wet, W.J. Synthesis of a shortened pro-alpha 2(I) chain and decreased synthesis of pro-alpha 2(I) chains in a proband with osteogenesis imperfect / W.J. De Wet, T. Pihlajaniemi, J. Myers [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1983. – Vol. 258, no. 12. – Pp. 7721–7728.
286. Deegan, P.B. Imiglucerase in the treatment of Gaucher disease: a history and perspective / P.B. Deegan, T.M. Cox // *Drug Des. Devel. Ther.* – 2012. – No. 6. – Pp. 81–106. DOI: 10.2147/DDDT.S14395.
287. Dehghani, S.M. Clinical and para clinical findings in the children with tyrosinemia referring for liver transplantation / S.M. Dehghani, M. Haghighat, M. Imanieh [et al.] // *Int. J. Prev. Med.* – 2013. – Vol. 4, no. 12. – Pp. 1380–1385.
288. Dellefave, L. Sarcomere mutations in cardiomyopathy, noncompaction, and the developing heart / L. Dellefave, E.M. McNally // *Circulation.* – 2008. – Vol. 117, no. 22. – Pp. 2847–2849. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.781518
289. Demers, S.I. Frequent mutation reversion inversely correlates with clinical severity in a genetic liver disease, hereditary tyrosinemia / S.I. Demers, P. Russo, F. Lettre, R.M. Tanguay // *Hum Pathol.* – 2003. – Vol. 34, no. 12. – Pp. 1313–1320. DOI: 10.1016/s0046-8177(03)00406-4
290. Den Haan, A.D. Comprehensive desmosome mutation analysis in North Americans with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy / A.D. Den Haan, B.Y. Tan, M.N. Zikusoka [et al.] // *Circ Cardiovasc Genet.* – 2009. – Vol. 2, no. 5. – Pp. 428–435. DOI: 10.1161/CIRCGENETICS.109.858217
291. Dhillon, K.S. Improved tandem mass spectrometry (MS/MS) derivatized method for the detection of tyrosinemia type I, amino acids and acylcarnitine disorders using a single extraction process / K.S. Dhillon, A.S. Bhandal, C.P. Aznar [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* – 2011. – Vol. 412, no. 11–12. – Pp. 873–879. DOI: 10.1016/j.cca.2010.12.028

292. Diadenode. Bioruptor® Pico Sonication System. User Manual. – Available at: https://www.diadenode.com/files/products/shearing_technology/bioruptor/Bioruptor_pico_manual.pdf.
293. Dickson, P.I. Novel treatments and future perspectives: outcomes of intrathecal drug delivery / P.I. Dickson // *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* – 2009. – Vol. 47 (Suppl 1). – Pp. S124–S127.
294. Doyard, M. FAM46A mutations are responsible for autosomal recessive osteogenesis imperfect / M. Doyard, S. Bacrot, C. Huber [et al.] // *J. Med. Genet.* – 2018. – Vol. 55, no. 4. – Pp. 278–284. DOI: 10.1136/jmedgenet-2017-104999
295. Drera, B. Loeys-Dietz syndrome type I and type II: clinical findings and novel mutations in two Italian patients / B. Drera, M. Ritelli, N. Zoppi [et al.] // *Orphanet J. Rare Dis.* – 2009. – No. 4, art. num. 24. – 5 p. DOI: 10.1186/1750-1172-4-24
296. Dreyfus, J. White blood cells and the diagnosis of alpha-glucosidase deficiency / J. Dreyfus, L. Poenaru // *Pediatr. Res.* – 1980. – No. 14. – Pp. 342–344. DOI: 10.1203/00006450-198004000-00017
297. Drugan, C. Gaucher disease in Romanian patients: incidence of the most common mutations and phenotypic manifestations / C. Drugan, L. Procopciuc, G. Jebeleanu [et al.] // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2002. – Vol 10, no. 9. – Pp. 511–515. DOI: 10.1038/sj.ejhg.5200845
298. Dursun, A. Mutation spectrum of fumarylacetoacetase gene and clinical aspects of tyrosinemia type I disease / A. Dursun, R.K. Ozgul, S. Sivri [et al.] // *JIMD Rep.* – 2011. – No. 1. – Pp. 17–21. DOI: 10.1007/8904_2011_10
299. Dusek, J. Postnatal persistence of spongy myocardium with embryonic blood supply / J. Dusek, B. Ostadal, M. Duskova // *Arch. Pathol.* – 1975. – Vol. 99, no. 6. – Pp. 312–317.
300. Ebbesen, F. Infantile nephropathiccystinosis in Denmark / F. Ebbesen, K.I. Mygind, F. Holck // *Danish Med. Bull.* – 1976. – Vol. 23, no. 5. – Pp. 216–222.
301. Ecel, M. Diagnosis of Nephropathic Cystinosis in a Child During Routine Eye Exam / M. Ecel, A. Sari, A. Delibaş // *Turk. J. Ophthalmol.* – 2017. – Vol. 47, no. 5. – Pp. 292–295. DOI: 10.4274/tjo.69922
302. Echevarria, L. X-chromosome inactivation in female patients with Fabry disease / L. Echevarria, K. Benistan, A. Toussaint [et al.] // *Clin. Genet.* – 2016. – Vol. 89, no. 1. – Pp. 44–54. DOI: 10.1111/cge.12613
303. Eddy, A.A. Nephrotic syndrome of childhood / A.A. Eddy, J.M. Simons // *Lancet.* – 2003. – Vol. 362, no. 9384. – Pp. 629–639. DOI: 10.1016/S0140-6736(03)14184-0
304. Ehlermann, P. Adverse events in families with hypertrophic or dilated cardiomyopathy and mutations in the MYBPC3 gene / P. Ehlermann, D. Weichenhan, J. Zehelein [et al.] // *BMC Med. Genet.* – 2008. – No. 9. – P. 95. DOI: 10.1186/1471-2350-9-95
305. Ekstein, J. Mutation frequencies for glycogen storage disease Ia in the Ashkenazi Jewish population / J. Ekstein, B.Y. Rubin, S.L. Anderson [et al.] // *Am. J. Med. Genet. A.* – 2004. – Vol. 129A, no. 2. – Pp. 162–164. DOI: 10.1002/ajmg.a.30232
306. El Bakkali, L. Nephrotic syndrome in The Netherlands: a population-based cohort study and a review of the literature / L. El Bakkali, R.R. Pereira, D.J. Kuik [et al.] // *Pediatr. Nephrol.* – 2011. – Vol. 26, no. 8. – Pp. 1241–1246. DOI: 10.1007/s00467-011-1851-8

307. Elie, V. Physiopathology of idiopathic nephrotic syndrome: lessons of glucocorticoids and epigenetic perspectives / V. Elie, M. Fakhoury, G. Deschènes, E. Jacqz-Aigrain // *Pediatr. Nephrol.* – 2012. – Vol. 27, no. 8. – Pp. 1249–1256. DOI: 10.1007/s00467-011-1947-1
308. El-Karakasy, H. The effect of tailoring of cornstarch intake on stature in children with glycogen storage disease type III / H. El-Karakasy, M.S. El-Raziky, G. Anwar, E. Mogahed // *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* – 2015. – Vol. 28, no. 1–2. – Pp. 195–200. DOI: 10.1515/jpem-2014-0145
309. Ellaway, C. Paediatric Fabry disease / C. Ellaway // *Transl. Pediatr.* – 2016. – Vol. 5, no. 1. – Pp. 36–42. DOI: 10.3978/j.issn.2224-4336.2015.12.02
310. Elliott, P. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases / P. Elliott, B. Andersson, E. Arbustini [et al.] // *Eur. Heart J.* – 2008. – Vol. 29, no. 2. – Pp. 270–276. DOI: 10.1093/eurheartj/ehm342
311. Elliott, S. Pilot study of newborn screening for six lysosomal storage diseases using tandem mass spectrometry / S. Elliott, N. Buroker, J.J. Cournoyer [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* – 2016. – Vol. 118, no. 4. – Pp. 304–309. DOI: 10.1016/j.ymgme.2016.05.015
312. Elmonem, M.A. Cystinosis: a review / M.A. Elmonem, K.R. Veys, N.A. Soliman [et al.] // *Orphanet J. Rare Dis.* – 2016. – No. 11, art. num. 47. – 17 p. DOI: 10.1186/s13023-016-0426-y
313. Elmonem, M.A. Lysosomal storage disorders in Egyptian children / M.A. Elmonem, I. G. Mahmoud, D.A. Mehaney [et al.] // *Ind. J. Pediatr.* – 2016. – Vol. 83, no. 8. – Pp. 805–813. DOI: 10.1007/s12098-015-2014-x
314. Elpeleg, O.N. Mutation analysis of the FAH gene in Israeli patients with tyrosinemia type I / O.N. Elpeleg, A. Shaag, E. Holme [et al.] // *Hum. Mutat.* – 2002. – Vol. 19, no. 1. – Pp. 80–81. DOI: 10.1002/humu.9001
315. Elstein, D. X-inactivation in Fabry disease / D. Elstein, E. Schachamov, R. Beerli, G. Altarescu // *Gene.* – 2012. – Vol. 505, no. 2. – Pp. 266–268. DOI: 10.1016/j.gene.2012.06.013
316. Emma, F. Nephropathic cystinosis: an international consensus document / F. Emma, G. Nesterova, C. Langman [et al.] // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2014. – No. 29 (Suppl 4). – Pp. iv87–iv94. DOI: 10.1093/ndt/gfu090
317. Endo, F. Tyrosinaemia type I and apoptosis of hepatocytes and renal tubular cells / F. Endo, M.S. Sun // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2002. – Vol. 25, no. 3.– Pp. 227–234. DOI: 10.1023/a:1015646400182
318. Endo, Y. Egyptian glycogen storage disease type III – identification of six novel AGL mutations, including a large 1.5 kb deletion and a missense mutation p.L620P with subtype IIIId / Y. Endo, E. Fateen, M. El Shabrawy [et al.] // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2009. – Vol. 47, no. 10. – Pp. 1233–1238. DOI: 10.1515/CCLM.2009.281
319. Eng, C.M. Nature and frequency of mutations in the alpha-galactosidase A gene that cause Fabry disease / C.M. Eng, L.A. Resnick-Silverman, D.J. Niehaus [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 1993. – No. 53. – Pp. 1186–1197. – Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1682507/pdf/ajhg00057-0029.pdf>.
320. Engberding, R. Identification of a rare congenital anomaly of the myocardium by twodimensional echocardiography: persistence of isolated myocardial sinusoids /

R. Engberding, F. Bender // *Am. J. Cardiol.* – 1984. – Vol. 53, no. 11. – Pp. 1733–1734. DOI: 10.1016/0002-9149(84)90618-0

321. Ewert, R. Glycogenesis type IV as a seldom cause of cardiomyopathy– report about a successful heart transplantation / R. Ewert, A. Gulijew, R. Wensel [et al.] // *Z. Kardiol.* – 1999. – Vol. 88, no. 10. – Pp. 850–856. DOI: 10.1007/s003920050361

322. Fabry, J. Ein Beitrag zur Kenntnis der Purpura haemorrhagica nodularis (Purpura papulosahaemorrhagica Hebrae) / J. Fabry // *Archiv für Dermatologie und Syphilis.* – Berlin, 1898. – No. 43. – Pp. 187–200. DOI: 10.1007/BF01986897

323. Fallerini, C. Unbiased next generation sequencing analysis confirms the existence of autosomal dominant Alport syndrome in a relevant fraction of cases / C. Fallerini, L. Dosa, R. Tita [et al.] // *Clin. Genet.* – 2014. – Vol. 86, no. 3. – Pp. 252–257. DOI: 10.1111/cge.12258

324. Fan, K.Y. Isolated left ventricular non-compaction: an unusual indication for heart transplantation / K.Y. Fan, C.W. S. Chan, L.C. Cheng [et al.] // *Hong Kong Med. J.* – 2009. – Vol. 15, no. 5. – Pp. 378–380. – Available at: <https://www.hkmj.org/system/files/hkm0910p378.pdf>.

325. Fananapazir, L. Genotype-phenotype correlations in hypertrophic cardiomyopathy. Insights provided by comparisons of kindreds with distinct and identical beta-myosin heavy chain gene mutations / L. Fananapazir, N.D. Epstein // *Circulation.* – 1994. – Vol. 89, no. 1. – Pp. 22–32. DOI: 10.1161/01.cir.89.1.22

326. Farber, C.R. A novel IFITM5 mutation in severe atypical osteogenesis imperfecta type VI impairs osteoblast production of pigment epithelium-derived factor / C.R. Farber, A. Reich, A.M. Barnes [et al.] // *J. Bone Miner. Res.* – 2014. – Vol. 29, no. 6. – Pp. 1402–1411. DOI: 10.1002/jbmr.2173

327. Faul, C. Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton / C. Faul, K. Asanuma, E. Yanagida-Asanuma [et al.] // *Trends Cell Biol.* – 2007. – Vol. 17, no. 9. – Pp. 428–437. DOI: 10.1016/j.tcb.2007.06.006

328. FDA Executive Summary : Clinical Chemistry and Clinical Toxicology Devices Panel : Seeker System Babies, Inc (DEN150035). – 2016. – 59 p. – Available at: <https://www.fda.gov/media/99705/download>.

329. FDA Prescription and Over-the-Counter Drug Product List. Additions/Deletions for Prescription Drug Product List. – 2012. – 32nd ed. (Suppl 3). – 20 p. – Available at: <https://wayback.archive-it.org/7993/20170113035559/>

330. Fedele, A.O. Sanfilippo syndrome: causes, consequences, and treatments / A.O. Fedele // *Appl. Clin. Genet.* – 2015. – Vol. 8. – Pp. 269–281. DOI: 10.2147/TACG.S57672

331. Fernandes, J. Inborn metabolic diseases : Diagnosis and treatment / J. Fernandes, J.-M. Saudubray, G. van den Berghe, J.H. Walter (Eds.). – 4th ed. – Springer Medizin Verlag, 2006. – 564 p.

332. Ferreira, F. CTNS Molecular genetics profile in a Portuguese cystinosis population / F. Ferreira, I. Leal, D. Sousa, T. Costa // *Open J. Genet.* – 2018. – Vol. 8, no. 4. – Pp. 91–100. DOI: 10.4236/ojgen.2018.84008

333. Filocamo, M. Lysosomal storage disorders: Molecular basis and laboratory testing / M. Filocamo, A. Morrone // *Hum Genomics.* – 2011. – Vol. 5, no. 3. – Pp. 156–169. DOI: 10.1186/1479-7364-5-3-156

334. Fine, L.G. Richard Bright 1789–1858: Physician in an Age of Revolution and Reform / L.G. Fine, J.A. English // *N. Engl. J. Med.* – 1993. – Vol. 329. – Pp. 1823. DOI: 10.1056/NEJM199312093292422
335. Finsterer, J. Cardiogenetics, neurogenetics, and pathogenetics of left ventricular hypertrabeculation/noncompaction / J. Finsterer // *Pediatr. Cardiol.* – 2009. – Vol. 30, no. 5. – Pp. 659–681. DOI: 10.1007/s00246-008-9359-0
336. Fischer, E.H. Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts / E.H. Fischer, E.G. Krebs // *J. Biol. Chem.* – 1955. – Vol. 216, no. 1. – Pp. 121–132.
337. Fitzpatrick, A.P. Familial restrictive cardiomyopathy with atrioventricular block and skeletal myopathy / A.P. Fitzpatrick, L.M. Shapiro, A.F. Rickards, P.A. Poole-Wilson // *Br. Heart J.* – 1990. – Vol. 63, no. 2. – Pp. 114–118. DOI: 10.1136/hrt.63.2.114
338. Folkestad, L. Bone geometry, density, and microarchitecture in the distal radius and tibia in adults with osteogenesis imperfecta type I assessed by high-resolution pQCT / L. Folkestad, J.D. Hald, S. Hansen [et al.] // *J. Bone Miner. Res.* – 2012. – Vol. 27, no. 6. – Pp. 1405–1412. DOI: 10.1002/jbmr.1592
339. Forbes, G.B. Glycogen storage disease. Report of a case with abnormal glycogen structure in liver and skeletal muscle / G.B. Forbes // *J. Pediatr.* – 1953. – Vol. 42, no. 6. – Pp. 645–652. DOI: 10.1016/s0022-3476(53)80420-8
340. Forestier, L. Molecular characterization of CTNS deletions in nephropathic cystinosis: development of a PCR-based detection assay / L. Forestier, G. Jean, M. Attard [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 1999. – Vol. 65, no. 2. – Pp. 353–359. DOI: 10.1086/302509
341. Forlino, A. New perspectives on osteogenesis imperfect / A. Forlino, W.A. Cabral, A.M. Barnes, J.C. Marini // *Nat. Rev. Endocrinol.* – 2011. – Vol. 7, no. 9. – Pp. 540–557. DOI: 10.1038/nrendo.2011.81
342. Forlino, A. Osteogenesis imperfecta / A. Forlino, J. Marini // *Lancet.* – 2016. – Vol. 387, no. 10028. – Pp. 1657–1671. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)00728-X
343. Forlino, A. Osteogenesis imperfecta: prospects for molecular therapeutics / A. Forlino, J. Marini // *Mol. Genet. Metab.* – 2000. – Vol. 71, no. 1–2. – Pp. 225–232. DOI: 10.1006/mgme.2000.3039
344. Frederiksen, A.L. Asymptomatic parental mosaicism for osteogenesis imperfecta associated with a new splice site mutation in COL1A2 / A.L. Frederiksen, M. Duno, I. Johnsen [et al.] // *Clin. Case Rep.* – 2016. – Vol. 4, no. 10. – Pp. 972–978. DOI: 10.1002/ccr3.658
345. Frese, K.S. Next-generation sequencing: from understanding biology to personalized medicine / K.S. Frese, H.A. Katus, B. Meder // *Biology (Basel).* – 2013. – Vol. 2, no. 1. – Pp. 378–398. DOI: 10.3390/biology2010378
346. Froese, D.S. Structural basis of glycogen branching enzyme deficiency and pharmacologic rescue by rational peptide design / D.S. Froese, A. Michaeli, T.J. McCorvie [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* – 2015. – Vol. 24, no. 20. – Pp. 5667–5676. DOI: 10.1093/hmg/ddv280
347. Froissart, R. Fabry disease: D313Y is an alpha-galactosidase A sequence variant that causes pseudodeficient activity in plasma / R. Froissart, N. Guffon, M/T. Vanier [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* – 2003. – Vol. 80, no. 3. – Pp. 307–314. DOI: 10.1016/S1096-7192(03)00136-7

348. Froissart, R. Glucose-6-phosphatase deficiency / R. Froissart, M. Piraud, A.M. Boudjemline [et al.] // *Orphanet J. Rare Dis.* – 2011. – No. 6, art. num. 27. – 12 p. DOI: 10.1186/1750-1172-6-27
349. Frustaci, A. Pathology and Function of Conduction Tissue in Fabry Disease Cardiomyopathy / A. Frustaci, E. Morgante, M.A. Russo [et al.] // *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* – 2015. – Vol. 8, no. 4. – Pp. 799–805. DOI: 10.1161/CIRCEP.114.002569
350. Fukuda, T. Autophagy and mistargeting of therapeutic enzyme in skeletal muscle in Pompe disease / T. Fukuda, M. Ahearn, A. Roberts [et al.] // *Mol. Ther.* – 2006. – Vol. 14. – Pp. 831–839. DOI: 10.1016/j.ymthe.2006.08.009
351. Fukuhara, Y. A molecular analysis of the GAA gene and clinical spectrum in 38 patients with Pompe disease in Japan / Y. Fukuhara, N. Fuji, N. Yamazaki [et al.] // *Mol. Genet. Metab. Rep.* – 2018. – Vol. 14. – Pp. 3–9. DOI: 10.1016/j.ymgmr.2017.10.009
352. Fuller, M. Absence of α -galactosidase cross-correction in Fabry heterozygote cultured skin fibroblasts / M. Fuller, N. Mellett, L.K. Hein [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* – 2015. – Vol. 114, no. 2. – Pp. 268–273. DOI: 10.1016/j.umgme.2014.11.005
353. Fuller, M. Epidemiology of lysosomal storage diseases: an overview / M. Fuller, P.J. Meikle, J.J. Hopwood // *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS.* – Oxford: Oxford PharmaGenesis; 2006. – Chapter 2. – Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11603/>.
354. Fuller, D.D. The respiratory neuromuscular system in Pompe disease / D.D. Fuller, M.K. Elmallah, B.K. Smith [et al.] // *Respir. Physiol. Neurobiol.* – 2013. – Vol. 189, no. 2. – Pp. 241–249. DOI: 10.1016/j.resp.2013.06.007
355. Gabrielli, O. Enzyme-replacement therapy in a 5-month-old boy with attenuated presymptomatic MPS I: 5-year follow-up / O. Gabrielli, L.A. Clarke, S. Bruni [et al.] // *Pediatrics.* – 2010. – Vol. 125. – Pp. 183–187. DOI: 10.1542/peds.2009-1728
356. Gahl, W. Cystinosis / W. Gahl, J. Thoene, J. Schneider // *N. Engl. J. Med.* – 2002. – Vol. 347, no. 2. – Pp. 111–21. DOI: 10.1056/NEJMra020552
357. Gahl, W.A. Cysteamine depletes cystinotic leucocyte granular fractions of cystine by the mechanism of disulphideinterchange / W.A. Gahl, F. Tietze, J.D. Butler [et al.] // *Biochem. J.* – 1985. – Vol. 228, no. 3. – Pp. 545–550. DOI: 10.1042/bj2280545
358. Gahl, W.A. Cystinosis coming of age / W. A. Gahl // *Adv. Pediatr.* – 1986. – Vol. 33. – Pp. 95–126
359. Gahl, W. Corneal crystals in nephropathic cystinosis: natural history and treatment with cysteamine eyedrops / W. Gahl, E. Kuehl, F. Iwata [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* – 2000. – Vol. 71, no. 1–2. – Pp. 100–120. DOI: 10.1006/mgme.2000.3062
360. Gahl, W.A. Nephropathic cystinosis in adults: natural history and effects of oral cysteamine therapy / W.A. Gahl, J.Z. Balog, R. Kleta // *Ann. Intern. Med.* – 2007. – Vol. 147. – Pp. 242–250. DOI: 10.7326/0003-4879-147-4-200708210-00006
361. Gaide Chevronnay, H.P. Time course of pathogenic and adaptation mechanisms in cystinotic mouse kidneys / H.P. Gaide Chevronnay, V. Janssens, P. Van Der Smissen [et al.] // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2014. – Vol. 25, no. 6. – Pp. 1256–1269. DOI: 10.1681/ASN.2013060598



362. Garcia Segarra, N. Maternal and fetal tyrosinemia type I / N. Garcia Segarra, S. Roche, A. Imbard [et al.] // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2010. – Vol. 33 (Suppl 3). – Pp. 507–510. DOI: 10.1007/s10545-012-9569-8
363. García-Rodríguez, B. Gaucher disease: a pyrosequencing frequency analysis of the N370S and L444P mutations in the Spanish population / B. García-Rodríguez, P. Alfonso, M. Mall [et al.] // *Clin. Genet.* – 2012. – Vol. 81, no. 5. – Pp. 495–497. DOI: 10.1111/j.1399-0004.2011.01757.x
364. Garidi, G. Familial forms of nephrotic syndrome / G. Garidi, A. Trivelli, S. Sanna-Cherchi [et al.] // *Pediatr. nephrol.* – 2010. – Vol. 25, no. 2. – Pp. 241–252. DOI: 10.1007/s00467-008-1051-3
365. Garrod, A.E. *Inborn Errors of metabolism* / A.E. Garrod. – London: Oxford Univ. Press., 1923.
366. Gaucher, P.C. E. De l'épithélioma primitif de la rate, hypertrophie idiopathique de la rate sans leucémie : PhD thesis / P.C. E. Gaucher. – Paris, France, 1882.
367. Gbadegesin, R. Mutations in PLCE1 are a major cause of isolated diffuse mesangial sclerosis (IDMS) / R. Gbadegesin, B.G. Hinkes, B.E. Hoskins [et al.] // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2008. – Vol. 23, no. 4. – Pp. 1291–1297. DOI: 10.1093/ndt/gfm759
368. Gbadegesin, R.A. Genetic testing in nephrotic syndrome—challenges and opportunities / R.A. Gbadegesin, M.P. Winn, W.E. Smoyer // *Nat. Rev. Nephrol.* – 2013. Vol. 9, no. 3. – Pp. 179–184. DOI: 10.1038/nrneph.2012.286
369. Gee, H.Y. ARHGDI mutations cause nephrotic syndrome via defective RHO GTPase signaling / H.Y. Gee, P. Saisawat, S. Ashraf [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2013. – Vol. 123, no. 8. – Pp. 3243–3253. DOI: 10.1172/JCI69134
370. Geisterfer-Lowrance, A. A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation / A. Geisterfer-Lowrance, S. Kass, G. Tanigawa [et al.] // *Cell.* – 1990. – Vol. 62, no. 5. – Pp. 999–1006. DOI: 10.1016/0092-8674(90)90274-i
371. Gelb, M.H. Newborn Screening for Lysosomal Storage Diseases: Methodologies, Screen Positive Rates, Normalization of Datasets, Second-Tier Tests, and Post-Analysis Tools / M.H. Gelb // *Int. J. Neonatal. Screen.* – 2018. – Vol. 4, no. 3. – Pp. 23. DOI: 10.3390/ijns4030023
372. GenBank Accession. – Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.
373. GeneCards: The Human Gene Database. – Available at: <https://www.genecards.org/>.
374. GeneCards: The Human Gene Database. FAH Gene (Protein Coding). – Available at: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FAH>.
375. Genetics Home Reference : Glycogen storage disease type IV. – 2013. – 6 p. – Available at: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/glycogen-storage-disease-type-iv#statistics>.
376. Genome Aggregation Database (gnomAD). – Available at: <https://gnomad.broadinstitute.org>.
377. Germain, D.P. Treatment of Fabry's disease with the pharmacologic chaperone migalastat / D.P. Germain, D.A. Hughes, K. Nicholls [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2016. – Vol. 375, no. 6. – Pp. 545–555. DOI: 10.1056/NEJMoa1510198

378. Gertsman, I. Diagnosis and monitoring of cystinosis using immunomagnetically purified granulocytes / I. Gertsman, W.S. Johnson, C. Nishikawa [et al.] // *Clin. Chem.* – 2016. – Vol. 62, no. 5. – Pp. 766–772. DOI: 10.1373/clinchem.2015.252494
379. Ghazi, F. CTNS molecular genetics profile in a Persian nephropathic cystinosis population / F. Ghazi, R. Hosseini, M. Akouchekiana [et al.] // *Nefrologia.* – 2017. – Vol. 37, no. 3. – Pp. 301–310. DOI: 10.1016/j.nefro.2016.11.024
380. Ghosh, A. Enzyme replacement therapy prior to haematopoietic stem cell transplantation in Mucopolysaccharidosis Type I: 10 year combined experience of 2 centres / A. Ghosh, W. Miller, P.J. Orchard [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* – 2016. – Vol. 117, no. 3. – Pp. 373–377. DOI: 10.1016/j.ymgme.2016.01.011
381. Ghosh, A. IDUA mutational profile and genotype-phenotype relationships in UK patients with Mucopolysaccharidosis Type I / A. Ghosh, J. Mercer, S. Mackinnon [et al.] // *Hum. Mutat.* – 2017. – Vol. 38, no. 11. – Pp. 1555–1568. DOI: 10.1002/humu.23301
382. Gibson, K. Back to the future: therapies for idiopathic nephrotic syndrome / K. Gibson, D. Glenn, M. Ferris // *Blood Purif.* – 2015. – Vol. 39, no.1–3. – Pp. 105–109. DOI: 10.1159/000368951
383. Giguère, Y. Québec's Neonatal Blood Screening Programme, CHUL du CHUQ, CHUL du CHUQ, Quebec, Canada. Neonatal mass screening for hereditary tyrosinemia type I in Quebec: a historical perspective (1970–2005). / Y. Giguère, J. Ruel, N. Belanger [et al.] // *APHL 2005: Proc. of the Newborn Screening and Genetic Testing Symposium, Portland, Oregon, USA, 2005.*
384. Girolami, F. Clinical Features and Outcome of Hypertrophic Cardiomyopathy Associated With Triple Sarcomere Protein Gene Mutations / F. Girolami, C.Y. Ho, C. Semsarian [et al.] // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2010. – Vol. 55, no. 14. – Pp. 1444–1453. DOI: 10.1016/j.jacc.2009.11.062
385. Giugliani, R. Guidelines for diagnosis and treatment of Hunter Syndrome for clinicians in Latin America / R. Giugliani, M. Villarreal, A. Valdez [et al.] // *Genet. Mol. Biol.* – 2014. – Vol. 37, no. 2. – Pp. 315–329. DOI: 10.1590/s1415-47572014000300003
386. Giugliani, R. Mucopolysaccharidoses: From understanding to treatment, a century of discoveries / R. Giugliani // *Genet. Mol. Biol.* – 2012. – Vol.35 (Suppl 4). – Pp. 924–931. DOI: 10.1590/s1415-47572012000600006
387. Giustarini, D. Age-related influence on thiol, disulfide and protein-mixed disulfide levels in human plasma / D. Giustarini, I. Dalle-Donne, S. Lorenzini [et al.] // *J. Gerontol. Biol. Sci.* – 2006. – Vol. 61, no. 10. – Pp. 1030–1038. DOI: 10.1093/Gerona/61.10.1030
388. Global Genes. – Available at: <https://globalgenes.org/rare-diseases-facts-statistics/>.
389. Glorieux, F.H. Osteogenesis imperfecta type VI: a form of brittle bone disease with a mineralization defect / F.H. Glorieux, L.M. Ward, F. Rauch [et al.] // *J. Bone Miner. Res.* – 2002. – Vol. 17, no. 1. – Pp. 30–38. DOI: 10.1359/jbmr.2002.17.1.30
390. Glorieux, F.H. Type V osteogenesis imperfecta: a new form of brittle bone disease / F.H. Glorieux, F. Rauch, H. Plotkin [et al.] // *J. Bone Miner. Res.* – 2000. – Vol. 15, no. 15. – Pp. 1650–1658. DOI: 10.1359/jbmr.2000.15.09.1650
391. Goker-Alpan, O. Divergent phenotypes in Gaucher disease implicate the role of modifiers / O. Goker-Alpan, K.S. Hruska, E. Orvisky [et al.] // *J. Med. Genet.* – 2005. – Vol. 42, no. 6. – P. 37. DOI: 10.1136/jmg.2004.028019

392. Goker-Alpan, O. Phenotypic continuum in neuronopathic Gaucher disease: an intermediate phenotype between type 2 and type 3 / O. Goker-Alpan, R. Schiffmann, J.K. Park [et al.] // *J. Pediatr.* – 2003. – Vol. 143, no. 2. – Pp. 273–276. DOI: 10.1067/S0022-34769(03)00302-0
393. Goldman, H. Use of dithiothreitol to correct cystine storage in cultured cystinotic fibroblasts / H. Goldman, C.R. Scriver, K. Aaron [et al.] // *Lancet.* – 1970. – Vol. 1. – Pp. 811–812. DOI: 10.1016/s0140-6736(70)92411-6
394. Goldstein, J.L. Molecular analysis of the AGL gene: identification of 25 novel mutations and evidence of genetic heterogeneity in patients with glycogen storage disease type III / J.L. Goldstein, S.L. Austin, K. Boyette [et al.] // *Genet. Med.* – 2010. – Vol. 12, no. 7. – Pp. 424–430. DOI: 10.1097/GIM.0b013e3181d94ea
395. Goldstein, J. Phosphorylase kinase deficiency / J. Goldstein, S. Austin, P. Kishnani [et al.] // *GeneReviews*[®] [Internet] / M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon [et al.] (Eds.). – Seattle (WA): University of Washington, 1993–2020. – 2011 [updated November 1, 2018]. – Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK55061/>.
396. Gomes, N.L. Long-term outcomes and molecular analysis of a large cohort of patients with 46,XY disorder of sex development due to partial gonadal dysgenesis / N.L. Gomes, A.M. Lerário, A.Z. Machado // *Clin. Endocrinol. (Oxf).* – 2018. – No. 89. – Pp. 164–177. DOI: 10.1111/cen.13717
397. Grabowski, G.A. Gaucher disease and other storage disorders / G.A. Grabowski // *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* – 2012. – Pp. 13–18. DOI: 10.1182/asheducation-2012.1.13
398. Greco, M. Long-term outcome of nephropathic cystinosis: a 20-year single-center experience / M. Greco, M. Brugnara, M. Zaffanello [et al.] // *Pediatr. Nephrol.* – 2010. – Vol. 25, no. 12. – Pp. 2459–2467. DOI: 10.1007/s00467-010-1641-8
399. Greeley, C.H. Fractures at Diagnosis in Infants and Children with Osteogenesis Imperfecta / C.H. Greeley, M. Donaruma-Kwoh, M. Vettimattam [et al.] // *J. Pediatr. Orthop.* – 2013. – Vol. 33, no. 1. – Pp. 32–36. DOI: 10.1097/BPO.0b013e318279c55d
400. Green, M.R. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* / M.R. Green, J. Sambrook. – 3 vol. set. – 4th ed. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2012. – 2028 p.
401. Green, R.C. American College of Medical Genetics and Genomics. ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing / R.C. Green, J.S. Berg, W.W. Grody [et al.] // *Genet. Med.* – 2013. – Vol. 15, no.7. – Pp. 565–574. DOI: 10.1038/gim.2013.73
402. Greka, A. Human genetics of nephrotic syndrome and the quest for precision medicine / A. Greka // *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* – 2016. – Vol. 25, no. 2. – Pp. 138–143. DOI: 10.1097/MNH.0000000000000204
403. Griner, P.F. Selection and interpretation of diagnostic tests and procedures. Principles and applications / P. F. Griner, R.J. Mayewsk, A.I. Mushlin [et al.] // *Ann. Intern. Med.* – 1981. – Vol. 94, no. 4, pt. 2. – Pp. 557–592.
404. Grompe, M.A. single mutation of the fumarylacetoacetate hydrolase gene in French Canadians with hereditary tyrosinemia type I / M. Grompe, M. St-Louis, S.I. Demers [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 1994. – Vol. 331, no. 6. – Pp. 353–357. DOI: 10.1056/NEJM199408113310603

405. Grompe, M. The pathophysiology and treatment of hereditary tyrosinemia type 1 / M. Grompe // *Semin. Liver Dis.* – 2001. – Vol. 21, no. 4. – Pp. 563–571. DOI: 10.1055/s-2001-19035
406. Gross, M.B. Personal Communication / M.B. Gross. – Baltimore, Maryland. Updated May 20, 2011. PMID: 14569098
407. Gross, S.J. Carrier screening in individuals of Ashkenazi Jewish descent / S.J. Gross, B.A. Pletcher, K.G. Monaghan // *Genet. Med.* – 2008. – Vol. 10, no. 1. – Pp. 54–56. DOI: 10.1097/GIM.0b013e31815f247c
408. Groza, T. The human phenotype ontology: Semantic Unification of Common and Rare Disease / T. Groza, S. Köhler, D. Moldenhauer [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2015. – Vol. 97, no. 1. – Pp. 111–124. DOI: 10.1016/j.ajhg.2015.05.020
409. Gungor, D. Survival and associated factors in 268 adults with Pompe disease prior to treatment with enzyme replacement therapy / D. Gungor, J.M. de Vries, W.C. Hop [et al.] // *Orphanet J. Rare Dis.* – 2011. – No. 6, art. num. 34. – 8 p. DOI: 10.1186/1750-1172-6-34
410. Gunstone, F.D. The lipid handbook / F.D. Gunstone, J.L. Harwood, F.B. Padley. – 2nd ed. – Chapman & Hall, London, 1994. – 1273 p.
411. Gupta, N. Type 2 Gaucher disease: phenotypic variation and genotypic heterogeneity / N. Gupta, I.M. Oppenheim, E.F. Kauvar [et al.] // *Blood Cells Mol. Dis.* – 2011. – Vol. 46, no. 1. – Pp. 75–84. DOI: 10.1016/j.bcmd.2010.08.012
412. Gupta, P. Genetic and ultrastructural studies in dilated cardiomyopathy patients: a large deletion in the lamin A/C gene is associated with cardiomyocyte nuclear envelope disruption / P. Gupta, Z.T. Bilinska, N. Sylvius [et al.] // *Basic Res. Cardiol.* – 2010. – Vol. 105, no. 3. – Pp. 365–377. DOI: 10.1007/s00395-010-0085-4
413. Ha, T.S. Roles of adaptor proteins in podocyte biology / T.S. Ha // *World J. Nephrol.* – 2013. – Vol. 2, no.1. – Pp. 1–10. DOI: 10.5527/wjn.v2.i1.1
414. Haas, J. Atlas of the clinical genetics of human dilated cardiomyopathy / J. Haas, K. Frese, B. Peil [et al.] // *Eur. Heart J.* – 2015. – Vol. 36, no. 18. – Pp. 1123–1135. DOI: 10.1093/eurheartj/ehu301
415. Haas, J. Alterations in cardiac DNA methylation in human dilated cardiomyopathy / J. Haas, K.S. Frese, Y.J. Park [et al.] // *EMBO Mol. Med.* – 2013. – Vol. 5, no. 3. – Pp. 413–429. DOI: 10.1002/emmm.201201553
416. Hadjigeorgiou, G.M. Novel donor splice site mutations of AGL gene in glycogen storage disease type IIIa / G.M. Hadjigeorgiou, G. P. Comi, A. Bordoni [et al.] // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 1999. – Vol. 22, no. 6. – Pp. 762–763. DOI: 10.1023/a:1005572906807
417. Hagemans, M.L. Clinical manifestation and natural course of late-onset Pompe's disease in 54 Dutch patients / M.L. Hageman, L.P. Winke, P.A. Van Doorn [et al.] // *Brain.* – 2005. – Vol. 128, pt. 3. – Pp. 671–677. DOI: 10.1093/brain/awh384
418. Hallopeau, H. Retrecissement ventriculo-aortique / H. Hallopeau // *Gazette de Medicine (Paris).* – 1869. – No. 24. – Pp. 683–684.
419. Hannun, Y.A. The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind / Y.A. Hannun, L.M. Obeid // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277, no. 29. – Pp. 25847–25850. DOI: 10.1074/jbc.R200008200

420. Harms, E. Neonatal screening for metabolic and endocrine disorders / E. Harms, B. Olgemöller // *DtschArztebl. Int.* – 2011. – Vol. 108, no. 1–2. – Pp. 11–21. DOI: 10.3238/arztebl.2011.0011
421. Harrington, J. Update on the evaluation and treatment of osteogenesis imperfecta / J. Harrington, E. Sochett, A. Howard // *Pediatr. Clin. North Am.* – 2014. – Vol. 61, no. 6. – Pp. 1243–1257. DOI: 10.1016/j.pcl.2014.08.010
422. Hartikka, H. Lack of correlation between the type of COL1A1 or COL1A2 mutation and hearing loss in osteogenesis imperfecta patients / H. Hartikka, K. Kuurila, J. Körkkö [et al.] // *Hum. Mutat.* – 2004. – Vol. 24, no. 2. – Pp. 147–154. DOI: 10.1002/humu.20071
423. Haskell, G.T. Whole Exome Sequencing Identifies Truncating Variants in Nuclear Envelope Genes in Patients With Cardiovascular Disease / G.T. Haskell, B.C. Jensen, L.A. Samsa [et al.] // *Circ. Cardiovasc. Genet.* – 2017. – Vol. 10, no. 3. DOI: 10.1161/CIRCGENETICS.116001443
424. Havndrup, O. The Val606Met mutation in the cardiac beta-myosin heavy chain gene in patients with familial hypertrophic cardiomyopathy is associated with a high risk of sudden death at young age / O. Havndrup, H. Bundgaard, P.S. Andersen [et al.] // *Am. J. Cardiol.* – 2001. – Vol. 87, no. 11. – Pp. 1315–1317. DOI: 10.1016/s0002-9149(01)01532-6
425. Heeringa, S.F. COQ6 mutations in human patients produce nephrotic syndrome with sensorineural deafness / S.F. Heeringa, G. Chernin, M. Chaki [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2011. – Vol. 121, no. 5. – Pp. 2013–2024. DOI: 10.1172/JCI45693
426. Heil, S.G. The molecular basis of Dutch infantile nephropathic cystinosis / S.G. Heil, E. Levtchenko, L.A. Monnens [et al.] // *Nephron.* – 2001. – Vol. 89, no. 1. – Pp. 50–55. DOI: 10.1159/000046043
427. Henderson, D. The development and structure of the ventricles in the human heart / D. Henderson, R. Anderson // *Pediatric Cardiology.* – 2009. – Vol. 30, no. 5. – Pp. 588–596. DOI: 10.1007/s00246-009-9390-9
428. Hendrickx, J. Complete genomic structure and mutational spectrum of PHKA2 in patients with X-linked liver glycogenosis type I and II / J. Hendrickx, P. Lee, J.P. Keating [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 1999. – Vol. 64, no. 6. – Pp. 1541–1549. DOI: 10.1086/302399
429. Hendriksz, C.J. Feeding infants with undiluted goat's milk can mimic tyrosinaemia type 1 / C.J. Hendriksz, J.H. Walter // *Acta Paediatr.* – 2004. – Vol. 93, no. 4. – Pp. 552–553. DOI: 10.1080/08035250410023791
430. Henry, W.L. Asymmetric septal hypertrophy. Echocardiographic identification of the pathognomonic anatomic abnormality of IHSS / W.L. Henry, C.E. Clark, S.E. Epstein // *Circulation.* – 1973. – Vol. 47, no. 2. – Pp. 225–233. DOI: 10.1161/01.cir.47.2.225
431. Herman, D.S. Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy / D.S. Herman, L. Lam, M.R. Taylor [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2012. – Vol. 366, no. 7. – Pp. 619–28. DOI: 10.1056/NEJMoa1110186
432. Hermans, M.M. Twenty-two novel mutations in the lysosomal alpha-glucosidase gene (GAA) underscore the genotype-phenotype correlation in glycogen storage disease type II / M.M. Hermans, D. van Leenen, M.A. Kroos [et al.] // *Hum. Mutat.* – 2004. – Vol. 23, no. 1. – Pp. 47–56. DOI: 10.1002/humu.10286
433. Hers, H.G. Alpha-glucosidase deficiency in generalize glycogen storage disease (Pompe's disease) / H.G. Hers // *Biochem. J.* – 1963. – Vol. 86. – Pp. 11–16. DOI: 10.1042/bj0860011

434. Hers, H.G. Enzymatic studies of hepatic fragments; application to the classification of glycogenesis / H.G. Hers // *Rev. Int. Hepatol.* (in French). – 1959. – Vol. 9, no. 1. – Pp. 35–55.
435. Hershberger, R.E. Dilated cardiomyopathy: the complexity of a diverse genetic architecture / R.E. Hershberger, D.J. Hedges, A. Morales // *Nat. Rev. Cardiol.* – 2013. – Vol. 10, no. 9. – Pp. 531–47. DOI: 10.1038/nrcardio.2013.105
436. Hershberger, R.E. Genetic evaluation of cardiomyopathy--a Heart Failure Society of America practice guideline / R.E. Hershberger, J. Lindenfeld, L. Mestroni [et al.] // *J. Card. Fail.* – 2009. – Vol. 15, no. 2. – Pp. 83–97. DOI: 10.1016/j.cardfail.2009.01.006
437. Hershberger, R.E. State of the Art Review. Update 2011: clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy / R.E. Hershberger, J.D. Siegfried // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2011. – Vol. 57, no. 16. – Pp. 1641–1649. DOI: 10.1016/j.jacc.2011.01.015
438. Hershberger, R.E. Coding sequence rare variants identified in MYBPC3, MYH6, TPM1, TNNC1, and TNNI3 from 312 patients with familial or idiopathic dilated cardiomyopathy / R.E. Hershberger, N. Norton, A. Morales [et al.] // *Circ. Cardiovasc. Genet.* – 2010. – Vol. 3, no. 2. – Pp. 155–161. DOI: 10.1116/CIRCGENETICS.109.912345
439. Hershkovitz, E. Glycogen storage disease type III in Israel: presentation and long-term outcome / E. Hershkovitz, I. Forschner, H. Mandel [et al.] // *Pediatr. Endocrinol. Rev.* – 2014. – Vol. 11, no. 3. – Pp. 318–323.
440. Hinkes, B. Positional cloning uncovers mutations in PLCE1 responsible for a nephrotic syndrome variant that may be reversible / B. Hinkes, R.C. Wiggins, R. Gbadegesin [et al.] // *Nat. Genet.* – 2006. – Vol. 38, no. 12. – Pp. 1397–1405. DOI: 10.1038/ng1918
441. Hinkes, B.G. Arbeitsgemeinschaft für Paediatrische Nephrologie Study Group: Nephrotic syndrome in the first year of life: two thirds of cases are caused by mutations in 4 genes (NPHS1, NPHS2, WT1, and LAMB2) / B.G. Hinkes, B. Mucha, C.N. Vlangos [et al.] // *Pediatrics.* – 2007. – Vol. 119, no. 4. – Pp. 907–919. DOI: 10.1542/peds.2006-2164
442. Hirschhorn, R. Glycogen Storage Disease Type II: Acid Alpha-Glucosidase (Acid Maltase) Deficiency / R. Hirschhorn, A.J. J. Reuser // *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* / C. Scriver, A. Beaudet, W. Sly [et al.] (Eds.). – 4 vol. set. – 8th ed. – New York: McGraw-Hill, 2001. – Pp. 3389–3420.
443. Ho Duy, B. Mutation analysis of the COL1A1 and COL1A2 genes in Vietnamese patients with osteogenesis imperfecta / B. Ho Duy, L. Zhytnik, K. Maasalu [et al.] // *Hum. Genomics.* – 2016. – Vol. 10, no. 1. – P. 27. DOI: 10.1186/s40246-016-0083-1
444. Hobbs, J.R. Reversal of clinical features of Hurler's disease and biochemical improvement after treatment by bone-marrow transplantation / J.R. Hobbs, K. Hugh-Jones, A.J. Barrett [et al.] // *Lancet.* – 1981. – Vol. 2, no. 8249. – Pp. 709–712. DOI: 10.1016/s0140-6736(81)91046-1
445. Hobson-Webb, L.D. The clinical and electrodiagnostic characteristics of Pompe disease with post-enzyme replacement therapy findings / L.D. Hobson-Webb, S. Dearnley, P.S. Kishnani // *Clin. Neurophysiol.* – 2011. – Vol. 122, no. 11. – Pp. 2312–2317. DOI: 10.1016/j.clinph.2011.04.016
446. Hoefsloot, L.H. Characterization of the human lysosomal alpha-glucosidase gene / L.H. Hoefsloot, M. Hoogeveen-Westerveld, A.J. Reuser [et al.] // *Biochem. J.* – 1990. – Vol. 272, no. 2. – Pp. 493–497. DOI: 10.1042/bj2720493

447. Hoffmann, B. Fabry disease: recent advances in pathology, diagnosis, treatment and monitoring / B. Hoffmann // *Orphanet J. Rare Dis.* – 2009. – No. 4, art. num. 21. – 9 p. DOI: 10.1186/1750-1172-4-21
448. Hogg, R. Evaluation and management of proteinuria and nephrotic syndrome in children: recommendations from a pediatric nephrology panel established at the National Kidney Foundation conference on proteinuria, albuminuria, risk, assessment, detection, and elimination (PARADE) / R. Hogg, R. Portman, D. Milliner [et al.] // *Pediatrics.* – 2000. – Vol. 105, no. 6. – Pp. 1242–1249. DOI: 10.1542/peds.105.6.1242
449. Hoogeveen, I.J. Normoglycemic ketonemia as biochemical presentation in ketotic glycogen storage disease / I.J. Hoogeveen, R.M. van der Ende, F.J. van Spronsen [et al.] // *JIMD Rep.* – 2015. – Vol. 28. – Pp. 41–47. DOI: 10.1007/8904_2015_511.
450. Hopkin, R.J. Characterization of Fabry disease in 352 pediatric patients in the Fabry Registry / R.J. Hopkin, J. Bissler, M. Banikazemi [et al.] // *Pediatr. Res.* – 2008. – Vol. 64, no. 5. – Pp. 550–555. DOI: 10.1203/PDR.0b013e318183f132
451. Hopwood, J.J. Molecular basis of mucopolysaccharidosis type II: mutations in the iduronate-2-sulphatase gene / J.J. Hopwood, S. Bunge, C.P. Morris [et al.] // *Hum. Mutat.* – 1993. – Vol. 2, no. 6. – Pp. 435–442. DOI: 10.1002/humu.1380020603
452. Horn, P.S. Reference intervals: an update. Review / P.S. Horn, A.J. Pesce // *Clin. Chim. Acta.* – 2003. – Vol. 334, no. 1–2. – Pp. 5–23. DOI: 10.1016/s0009-8981(03)00133-5
453. Horowitz, M. Prevalence of nine mutations among Jewish and non-Jewish Gaucher disease patients / M. Horowitz, G. Tzuri, N. Eyal [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 1993. – Vol. 53, no. 4. – Pp. 921–930.
454. Horowitz, M. The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: structure and evolution / M. Horowitz, S. Wilder, Z. Horowitz [et al.] // *Genomics.* – 1989. – Vol. 4, no. 1. – Pp. 87–96. DOI: 10.1016/0888-7543(89)90319-4
455. Hruska, K.S. Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA) / K.S. Hruska, M.E. LaMarca, C.R. Scott, E. Sidransky // *Hum. Mutat.* – 2008. – Vol. 29, no. 5. – Pp. 567–583. DOI: 10.1002/humu.20676
456. Hruskova, L. Eight mutations including 5 novel ones in the COL1A1 gene in Czech patients with osteogenesis imperfect / L. Hruskova, I. Fijalkowski, W. Van Hul [et al.] // *Biomed. Paper (Czech.).* – 2016. – Vol. 160, no. 3. – Pp. 442–447. DOI: 10.5507/bp.2016.022
457. Hug, G. Phosphorylase kinase of the liver: deficiency in a girl with increased hepatic glycogen / G. Hug, W.K. Schubert, G. Chuck // *Science.* – 1966. – Vol. 153, no. 3743. – Pp. 1534–1535. DOI: 10.1126/science.153.3743.1534
458. Hughes, D.A. Velaglucerase alfa (VPRIV) enzyme replacement therapy in patients with Gaucher disease: Long-term data from phase III clinical trials / D.A. Hughes, D.E. Gonzalez, E.A. Lukina [et al.] // *Am. J. Hematol.* – 2015. – Vol. 90, no. 7. – Pp. 584–591. DOI: 10.1002/ajh.24012
459. Huie, M.L. Aberrant splicing in adult onset glycogen storage disease type II (GSDII): molecular identification of an IVS1 (-13T->G) mutation in a majority of patients and a novel IVS10 (+1GT->CT) mutation / M.L. Huie, A.S. Chen, S. Tsujino [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* – 1994. – Vol. 3, no. 12. – Pp. 2231–2236. DOI: 10.1093/hmg/3.12.2231
460. Huijing, F. Amylo-1,6-glucosidase activity in normal leucocytes and in leucocytes of patients with glycogen-storage disease / F. Huijing // *Clin. Chim. Acta.* – 1964. – No. 9. – Pp. 269–272. DOI: 10.1016/0009-8981(64)90106-8

461. Hult, M. Epidemiology of lysosomal storage diseases in Sweden / M. Hult, N. Darin, U. von Döbeln, J.-E. Månsson // *Acta Paediatr.* – 2014. – Vol. 103, no. 12. – Pp. 1258–1263. DOI: 10.1111/apa.12807
462. Human Gene Mutation Database (HGMD) : Gene AGL. – Available at: <https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/gene.php?gene=AGL>.
463. Human Gene Mutation Database (HGMD) : Gene COL1A1/COL1A2.– Available at: <https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/gene.php?gene=COL1A1/COL1A2>.
464. Human Gene Mutation Database (HGMD) : Gene CTNS.– Available at: <https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/gene.php?gene=CTNS>.
465. Human Gene Mutation Database (HGMD) : Gene FAH.– Available at: <https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/gene.php?gene=FAH>.
466. Human Gene Mutation Database (HGMD) : Gene G6PC.– Available at: <https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/gene.php?gene=G6PC>.
467. Human Gene Mutation Database (HGMD) : Gene GAA.– Available at: <https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/gene.php?gene=GAA>.
468. Human Gene Mutation Database (HGMD) : Gene GBA.– Available at: <https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/gene.php?gene=GBA>.
469. Human Gene Mutation Database (HGMD) : Gene GBE1.– Available at: <https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/gene.php?gene=GBE1>.
470. Human Gene Mutation Database (HGMD) : Gene GLA.– Available at: <https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/gene.php?gene=GLA>.
471. Human Gene Mutation Database (HGMD) : Gene IDS.– Available at: <https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/gene.php?gene=IDS>.
472. Human Gene Mutation Database (HGMD) : Gene IDUA.– Available at: <https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/gene.php?gene=IDUA>.
473. Human Gene Mutation Database (HGMD) : Gene PHKA1.– Available at: <https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/gene.php?gene=PHKA1>.
474. Human Gene Mutation Database (HGMD) : Gene PHKA2.– Available at: <https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/gene.php?gene=PHKA2>.
475. Human Gene Mutation Database (HGMD) : Gene PHKB.– Available at: <https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/gene.php?gene=PHKB>.
476. Human Gene Mutation Database (HGMD) : Gene PHKG2.– Available at: <https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/gene.php?gene=PHKG2>.
477. Human Gene Mutation Database (HGMD) : Gene PYGL.– Available at: <https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/gene.php?gene=PYGL>.
478. Human Genome Variation Society (HGVS). – Available at: www.hgvs.org/mutnomen.
479. Humbel, R. Identification and quantitation of keratan sulfate in urine / R. Humbel // *Clin. Chim. Acta.* – 1974. – Vol. 52, no. 2. – Pp. 173–177. DOI: 10.1016/0009-8981(74)90207-1
480. Humbert, M. Pulmonary arterial hypertension and type-I glycogen-storage disease: the serotonin hypothesis / M. Humbert, P. Labrune, O. Sitbon [et al.] // *Eur. Respir. J.* – 2002. – Vol. 20, no. 1. – Pp. 59–65. DOI: 10.1183/09031936.02.00258702

481. Hunter, C.A. A rare disease in two brothers / C.A. Hunter // *Proceedings of the Royal Society of Medicine.* – London, 1917. – Vol 10, Section Dis. Children. – Pp. 104–116.
482. Hurler, G. Über einen typ multipler abartungen, vorwiegend am skelettsystem / G. Hurler // *Z. Kinder-Heilk.* – 1919. – Vol. 24. – Pp. 220–234.
483. Hutchesson, A.C. Comparison of disease and gene frequencies of inborn errors of metabolism among different ethnic groups in the West Midlands / A.C. Hutchesson, S. Bunday, M.A. Preece [et al.] // *UK J. Med. Genet.* – 1998. – Vol. 35, no. 5. – Pp. 366–370. DOI: 10.1136/jmg.35.5.366
484. Ijaz, S. Direct sequencing of FAH gene in Pakistani tyrosinemia type 1 families reveals a novel mutation / S. Ijaz, M.Y. Zahoor, M. Imran [et al.] // *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* – 2016. – Vol. 29, no. 3. – Pp. 327–332. DOI: 10.1515/jpem-2015-0289
485. Illingworth, B. Amylo-1,6-glucosidase in muscle tissue in generalized glycogen storage disease / B. Illingworth, G.T. Cori, C.F. Cori // *J. Biol. Chem.* – 1956. – Vol. 218, no. 1. – Pp. 123–129. – Available at: <https://www.jbc.org/content/218/1/123.long>
486. Illingworth, B. Structure of glycogens and amylopectins, III. Normal and abnormal human glycogen / B. Illingworth, G. Cori // *J. Biol. Chem.* – 1952. – Vol. 199, no. 2. – Pp. 653–659. – Available at: <https://www.jbc.org/content/199/2/653.long>.
487. Ingebritsen, T.S. The protein phosphatases involved in cellular regulation. 6. Measurement of type-1 and type-2 protein phosphatases in extracts of mammalian tissues; an assessment of their physiological roles / T.S. Ingebritsen, A.A. Stewart, P. Cohen // *Eur. J. Biochem.* – 1983. – Vol. 132, no. 2. – Pp. 297–307. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1983.tb07362.x
488. Ishikawa, Y. Mutation in cyclophilin B that causes hyperelastosis cutis in American Quarter Horse does not affect peptidylprolyl cis-trans isomerase activity but shows altered cyclophilin B-protein interactions and affects collagen folding / Y. Ishikawa, J.A. Vranka, S.P. Boudko [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2012. – Vol. 287, no. 26. – Pp. 22253–22265. DOI: 10.1074/jbc.M111.333336
489. Isogai, K. Mutation analysis in the iduronate-2-sulphatase gene in 43 Japanese patients with mucopolysaccharidosis type II (Hunter disease) / K. Isogai, K. Sukegawa, S. Tomatsu [et al.] // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 1998. – Vol. 21, no. 1. – Pp. 60–70. DOI: 10.1023/a:1005363414792
490. Iyer, S.G. Long-term results of living donor liver transplantation for glycogen storage disorders in children / S.G. Iyer, C.L. Chen, C.C. Wang [et al.] // *Liver Transpl.* – 2007. – Vol.13, no. 6. – Pp. 848–852. DOI: 10.1002/lt.21151
491. Jack, R.M. Validation of a therapeutic range for nitisinone in patients treated for tyrosinemia type 1 based on reduction of succinylacetone excretion / R.M Jack, C.R. Scott // *JIMD Reports.* – 2019. – No. 46. – Pp. 75–78. DOI: 10.1002/jmd2.12023
492. Jackson, M. Prenatal diagnosis of cystinosis by quantitative measurement of cystine in chorionic villi and cultured cells / M. Jackson, E. Young // *Prenat Diagn.* – 2005. – Vol. 25, no. 11. – Pp. 1045–1047. DOI: 10.1002/pd.1249
493. Jain, V. Steroid-resistant nephrotic syndrome with mutations in NPHS2 (podocin): report from a three-generation family / V. Jain, J. Feehally, G. Jones [et al.] // *Clin. Kidney J.* – 2014. – Vol. 7, no. 3. – Pp. 303–305. DOI: 10.1093/ckj/sfu028
494. Jaspers, K. Improving the reproducibility of MR-derived left ventricular volume and function measurements with a semi-automatic threshold-based segmentation algorithm /

- K. Jaspers, H.G. Freling, K. van Wijk [et al.] // *Int. J. Cardiovasc. Imaging*. 2013. – Vol. 29. – Pp. 617–623. DOI: 10.1007/s10554-012-0130-5
495. Jefferies, J.L. Pediatric Cardiomyopathy Registry Investigators. Cardiomyopathy phenotypes and outcomes for children with left ventricular myocardial noncompaction: results from the pediatric cardiomyopathy registry / J.L. Jefferies, J.D. Wilkinson, L.A. Sleeper [et al.] // *J. Card. Fail.* – 2015. – Vol. 21, no. 11. – Pp. 877–884. DOI: 10.1016/j.cardfail.2015.06.381
496. Jenni, R. Echocardiographic and pathoanatomical characteristics of isolated left ventricular non-compaction: a step towards classification as a distinct cardiomyopathy / R. Jenni, E. Oechslin, J. Schneider [et al.] // *Heart*. – 2001. – Vol. 86, no. 6. – Pp. 666–671. DOI: 10.1136/heart.86.6.666
497. Jeong, S.-Y. Identification of a novel recombinant mutation in Korean patients with Gaucher disease using a long-range PCR approach / S.-Y. Jeong, S.-J. Kim, J.-A. Yang [et al.] // *J. Hum. Genet.* – 2011. – Vol. 56, no. 6. – Pp. 469–471. DOI: 10.1038/jhg.2011.37
498. Johnson, LN. The regulation of protein phosphorylation / LN. Johnson // *Biochem. Soc. Trans.* – 2009. – Vol. 37, no. 4. – Pp. 627–641. DOI: 10.1042/BST037062
499. Johnson, S. An audit analysis of a guideline for the investigation and initial therapy of diarrhea negative (atypical) hemolytic uremic syndrome / S. Johnson, J. Stojanovic, G. Ariceta [et al.] // *Pediatr. Nephrol.* – 2014. – Vol. 29, no. 10. – Pp. 1967–1978. DOI: 10.1007/s00467-014-2817-4
500. Jones, S.A. Mortality and cause of death in mucopolysaccharidosis type II-a historical review based on data from the Hunter Outcome Survey (HOS) / S.A. Jones, Z. Almassy, M. Beck [et al.] // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2009. – Vol. 32, no. 4. – Pp. :534–543. DOI: 10.1007/s10545-009-1119-7
501. Jorquera, R. Fumarylacetoacetate, the metabolite accumulating in hereditary tyrosinemia, activates the ERK pathway and induces mitotic abnormalities and genomic instability / R. Jorquera, R.M. Tanguay // *Hum. Mol. Genet.* – 2001. – Vol. 10, no. 17. – Pp. 1741–1752. DOI: 10.1093/hmg/10.17.1741
502. Joshi, S. Genetics of steroid-resistant nephrotic syndrome: a review of mutation spectrum and suggested approach for genetic testing / S. Joshi, R. Andersen, B. Jespersen, S. Rittig // *Acta Paediatr.* – 2013. – Vol. 102, no. 9. – Pp. 844–856. DOI: 10.1111/apa.12317
503. Jurecka, A. Mucopolysaccharidosis type II in females and response to enzyme replacement therapy / A. Jurecka, Z. Krumina, Z. Zuber [et al.] // *Am. J. Med. Genet. A.* – 2012. – Vol. 158A, no. 2. – Pp. 450–454. DOI: 10.1002/ajmg.a.34415
504. Kalatzis, V. Cystinosis: from gene to disease / V. Kalatzis, C. Antignac // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2002. – Vol. 17, no. 11. – Pp. 1883–1886. DOI: 10.1093/ndt/17.11.1883.
505. Karam, S. A de novo mutation of the beta cardiac myosin heavy chain gene in an infantile restrictive cardiomyopathy / S. Karam, M. Raboisson, C. Ducreux [et al.] // *Congenit. Heart Dis.* – 2008. – Vol. 3, no. 2. – Pp. 138–143. DOI: 10.1111/j.1747-0803.2008.00165.x
506. Kari, J.A. Clinico-pathological correlations of congenital and infantile nephrotic syndrome over twenty years / J.A. Kari, G. Montini, D. Bockenbauer [et al.] // *Pediatr. Nephrol.* – 2014. – Vol. 29, no. 11. – Pp. 2173–2180. DOI: 10.1007/s00467-014-2856-x
507. Karle, S.M. Novel mutations in NPHS2 detected in both familial and sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome / S.M. Karle, B. Uetz, V. Ronner [et al.] // *J. Am. Soc.*



- Nephrol. – 2002. – Vol. 13, no. 2. – Pp. 388–393. – Available at: <https://jasn.asnjournals.org/content/jnephrol/13/2/388.full.pdf>.
508. Kasaai, B. Regulation of the Bone-restricted IFITM-like (Bril) Gene Transcription by Sp and Gli Family Members and CpG Methylation / B. Kasaai, M.-H. Gaumond, P. Moffatt // *J. Biol. Chem.* – 2013. – Vol. 288, no. 19. – Pp. 13278–13294. DOI: 10.1074/jbc.M113.457010
509. Kastner, D.L. Hereditary periodic fever syndromes / D.L. Kastner // *ASH Education Program Book.* – 2005. Pp. 74–81. DOI: 10.1182/asheducation-2005.1.74
510. Kato, Y. Isolation of pulmonary vein and superior vena cava for paroxysmal atrial fibrillation in a young adult with left ventricular non-compaction / Y. Kato, H. Horigome, M. Takahashi-Igari [et al.] // *Europace.* – 2010. – Vol. 12, no. 78. – Pp. 1040–1041. DOI: 10.1093/europace/euq108
511. Kelly, E.B. *Encyclopedia of Human Genetics and Disease.* – ABC-CLIO, 2012. – 613 p.
512. Kemper, AR. Newborn Screening for Mucopolysaccharidosis Type 1 (MPS I): A Systematic Review of Evidence Report of Final Findings (Final Version 1.1) / AR. Kemper. – 2015. – 67 p. – Available at: <https://www.hrsa.gov/sites/default/files/hrsa/advisory-committees/heritable-disorders/rusp/previous-nominations/mps1-external-evidence-review-report.pdf>.
513. Keren, A. Hypertrophic cardiomyopathy: the genetic determinants of clinical disease expression / A. Keren, P. Syrris, WJ. McKenna // *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* – 2008. – No. 5. – Pp. 158–68. DOI: 10.1038/ncpcardio1349
514. Kerti, A. NPHS2 p.V290M mutation in late-onset steroid-resistant nephrotic syndrome / A. Kerti, R. Csohány, A. Szabó [et al.] // *Pediatr. Nephrol.* – 2013. – Vol. 28, no. 5. – Pp. 751–757. DOI: 10.1007/s00467-012-2379-2
515. Keupp, K. Mutations in WNT1 cause different forms of bone fragility / K. Keupp, F. Beleggia, H. Kayserili [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2013. – Vol. 92, no. 4. – Pp. 565–574. DOI: 10.1016/j.ajhg.2013.02.010
516. Kiehnopf, M. Analysis of the CTNS gene in patients of German and Swiss origin with nephropathic cystinosis / M. Kiehnopf, J. Schickel, B. Gonne [et al.] // *Hum. Mutat.* – 2002. – Vol. 20, no. 3. – P. 237. DOI: 10.1002/humu.9063
517. Kim, M.S. Clinical and molecular characterization of Korean children with infantile and late-onset Pompe disease: 10 years of experience with enzyme replacement therapy at a single center / M.S. Kim, A. Song, M. Im [et al.] // *Korean J. Pediatr.* – 2019. – Vol. 62, no. 6. – Pp. 224–234. DOI: 10.3345/kjp.2018.06968
518. Kim, S.Y. Neutrophil stress and apoptosis underlie myeloid dysfunction in glycogen storage disease type Ib / S.Y. Kim, H.S. Jun, P.A. Mead [et al.] // *Blood.* – 2008. – Vol. 111, no. 12. – Pp. 5704–5711. DOI: 10.1182/blood-2007-12-129114
519. Kim, S.Z. Hepatocellular carcinoma despite long-term survival in chronic tyrosinaemia I / S.Z. Kim, K.G. Kupke, L. Ierardi-Curto [et al.] // *J. Inher. Metab. Dis.* – 2000. – Vol. 23, no. 8. – Pp. 791–804. DOI: 10.1023/a:1026756501669
520. Kindel, S.J. Pediatric cardiomyopathy: importance of genetic and metabolic evaluation / S.J. Kindel, E.M. Miller, R. Gupta [et al.] // *J. Card. Fail.* – 2012. – Vol. 18, no. 5. – Pp. 396–403. DOI: 10.1016/j.cardfail.2012.01.017
521. King, S.L. Tyrosinemia type I / S.L. King, C. Trahms, C.R. Scott // *GeneReviews*[®] [Internet] / M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon [et al.] (Eds.). – Seattle (WA): University

of Washington, 1993–2020. – 2006 [updated May 25, 2017]. – Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1515/>.

522. Kingma, S. An algorithm to predict phenotypic severity in mucopolysaccharidosis type I in the first month of life / S. Kingma, E. Langereis, C. de Klerk [et al.] // *Orphanet J. Rare Dis.* – 2013. – No. 8, art. num. 99. – 11 p. DOI: 10.1186/1750-1172-8-99

523. Kint, J.A. Fabry's disease: alpha-galactosidase deficiency / J.A. Kint // *Science.* – 1970. – No. 167. – Pp. 1268–1269.

524. Kirkilionis, A.J. Fabry disease in a large Nova Scotia kindred: carrier detection using leucocyte alpha-galactosidase activity and an NcoI polymorphism detected by an alpha-galactosidase cDNA clone / A.J. Kirkilionis, D.C. Riddell, M.W. Spence, R.G. Fenwick // *J. Med. Genet.* – 1991. – Vol. 28, no. 4. – Pp. 232–240. DOI: 10.1136/jmg.28.4.232

525. Kishnani, P.S. A retrospective, multinational, multicenter study on the natural history of infantile-onset Pompe disease / P.S. Kishnani, W.L. Hwu, H. Mandel [et al.] // *J. Pediatr.* – 2006. – Vol. 148, no. 5. – Pp. 671–676. DOI: 10.1016/j.jpeds.2005.11.033

526. Kishnani, P.S. Chinese hamster ovary cell-derived recombinant human acid alpha-glucosidase in Infantile-onset Pompe disease / P.S. Kishnani, M. Nicolino, T. Voit [et al.] // *J. Pediatr.* – 2006. – Vol. 149, no. 1. – Pp. 89–97. DOI: 10.1016/j.jpeds.2006.02.035

527. Kishnani, P.S. Diagnosis and management of glycogen storage disease type I: a practice guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics / P.S. Kishnani, S.L. Austin, J.E. Abdenur [et al.] // *Genet. Med.* – 2014. – Vol. 16, no. 11, e1. – 29 p. DOI: 10.1038/gim.2014.128

528. Kishnani, P.S. Glycogen storage disease type III diagnosis and management guidelines / P.S. Kishnani, S.L. Austin, P. Arn [et al.] // *Genet. Med.* – 2010. – Vol. 12, no. 7. – Pp. 446–463. DOI: 10.1097/GIM.0b013e3181e655b6

529. Kitagawa, T. Hepatorenal tyrosinemia / T. Kitagawa // *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* – 2012. – Vol. 88, no. 5. – Pp. 192–200.

530. Kivuva, E.C. De Barsy syndrome: a review of the phenotype / E.C. Kivuva, M.J. Parker, M.C. Cohen [et al.] // *Clin Dysmorphol.* – 2008. – Vol. 17, no. 2. – Pp. 99–107. DOI: 10.1097/MCD.0b013e3282f4a964

531. Klaassen, S. Mutations in sarcomere protein genes in left ventricular noncompaction / S. Klaassen, S. Probst, E. Oechslin [et al.] // *Circulation.* – 2008. – Vol. 117, no. 22. – Pp. 2893–2901. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.746164

532. Klamt, B. Frasier syndrome is caused by defective alternative splicing of WT1 leading to an altered ratio of WT1 +/-KTS splice isoforms / B. Klamt, A. Koziell, F. Poulat [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* – 1998. – Vol. 7, no. 4. – Pp. 709–714. DOI: 10.1093/hmg/7.4.709

533. Klebs, T. *Handbuch der pathologischen anatomie* / T. Klebs. Berlin: Hirschwald. 1870. – 634 p. – Available at: <http://mdz-nbn-resolving.de/urn:nbn:de:bvb:12-bsb11368936-9>.

534. Klein, C.J. Adult polyglucosan body disease: case description of an expanding genetic and clinical syndrome / C.J. Klein, C.J. Boes, J.E. Chapin [et al.] // *Muscle Nerve.* – 2004. – Vol. 29, no. 2. – Pp. 323–328. DOI: 10.1002/mus.10520

535. Kleta, R. CTNS mutations in African American patients with cystinosis / R. Kleta, Y. Anikster, C. Lucero [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* – 2001. – Vol. 74, no. 3. – Pp. 332–337. DOI: 10.1006/mgme.2001.3218

536. Kleta, R. First NIH/Office of Rare Diseases Conference on cystinosis: past, present, and future / R. Kleta, F. Kaskel, R. Dohil [et al.] // *Pediatr. Nephrol.* – 2005. – Vol. 20, no. 4. – Pp. 452–454. DOI: 10.1007/s00467-004-1777-5
537. Koeberl, D.D. Emerging therapies for glycogen storage disease type I / D.D. Koeberl, P.S. Kishnani, D. Bali, Y-T. Chen // *Trends Endocrinol. Metab.* – 2009. – Vol. 20, no. 5. – Pp. 252–258. DOI: 10.1016/j.tem.2009.02.003
538. Koeberl, D.D. In search of proof-of-concept: gene therapy for glycogen storage disease type Ia / D.D. Koeberl // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2012. – Vol. 35, no. 4. – Pp. 671–678. DOI:10.1007/s10545-012-9454-5
539. Kolter, T. Sphingolipid metabolism diseases / T. Kolter, K. Sandhoff // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – Vol. 1758, no. 12. – Pp. 2057–2079. DOI: 10.1016/j.bbamem.2006.05.027
540. Koprivica, V. Analysis and classification of 304 mutant alleles in patients with type 1 and type 3 Gaucher disease / V. Koprivica, D.L. Stone, J.K. Park [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2000. – Vol. 66, no. 6. – Pp. 1777–1786. DOI: 10.1086/302925
541. Kosho, T. A new Ehlers-Danlos syndrome with craniofacial characteristics, multiple congenital contractures, progressive joint and skin laxity, and multisystem fragility-related manifestations / T. Kosho, N. Miyake, A. Hatamochi [et al.] // *Am. J. Med. Genet. A.* – 2010. – Vol. 152A, no. 6. – Pp. 1333–1346. DOI: 10.1002/ajmg.a.33498
542. Koskimies, O. Long-term outcome of primary nephrotic syndrome / O. Koskimies, J. Vilska, J. Rapola, N. Hallman // *Arch. Dis. Child.* – 1982. – Vol. 57, no. 7. – Pp. 544–548. DOI: 10.1136/adc.57.7.544
543. Kostera-Pruszczyk, A. Juvenile onset acid maltase deficiency presenting as a rigid spine syndrome / A. Kostera-Pruszczyk, A. Opuchlik, A. Lugowska [et al.] // *Neuromuscul. Disord.* – 2006. – Vol. 16, no. 4. – Pp. 282–285. DOI: 10.1016/j.nmd.2006.02.001
544. Kosuga, M. Molecular diagnosis of 65 families with mucopolysaccharidosis type II Hunter syndrome characterized by 16 novel mutations in the IDS gene: Genetic, pathological, and structural studies on iduronate-2-sulfatase / M. Kosuga, R. Mashima, A. Hirakiyama [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* – 2016. – Vol. 118, no. 3. – Pp. 190–197. DOI: 10.1016/j.ymgme.2016.05.003
545. Kotanko, P. Results of a nationwide screening for Anderson-Fabry disease among dialysis patients / P. Kotanko, R. Kramar, D. Devrnja [et al.] // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2004. – Vol. 15, no. 5. – Pp. 1323–1329. DOI: 10.1097/01.asn.0000124671.61963.1e
546. Kowarz, L. Gaucher mutation N188S is associated with myoclonic epilepsy / L. Kowarz, O. Goker-Alpan, S. Banerjee-Basu [et al.] // *Hum. Mutat.* – 2005. – Vol. 26, no. 3. – Pp. 271–275. DOI: 10.1002/humu.20217
547. Krebs, E.G. Factors affecting the activity of muscle phosphorylase b kinase / E. G. Krebs, D.J. Graves, E.H. Fischer // *J. Biol. Chem.* – 1959. – No. 234. – Pp. 2867–2873.
548. Kroll, W.A. Decrease in free cystine content of cultured cystinotic fibroblasts by ascorbic acid / W.A. Kroll, J.A. Schneider // *Science.* – 1974. – Vol. 186, no. 4168. – Pp. 1040–1042. DOI: 10.1126/science.186.4168.1040
549. Kroos, M. Update of the Pompe disease mutation database with 107 sequence variants and a format for severity rating / M. Kroos, R.J. Pomponio, L. Vliet [et al.] // *Hum. Mutat.* – 2008. – Vol. 29, no. 6. – Pp. 13–26. DOI: 10.1002/humu.20745

550. Kumamoto, S. High frequency of acid α -glucosidase pseudodeficiency complicates newborn screening for glycogen storage disease type II in the Japanese population /S. Kumamoto, T. Katafuchi, K. Nakamura [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* – 2009. – Vol. 97, no. 3. – Pp. 190–195. DOI: 10.1016/j.ymgme.2009.03.004
551. Kushwaha, S.S. Restrictive cardiomyopathy /S.S. Kushwaha, J.T. Fallon, V. Fuster // *N. Engl. J. Med.* – 1997. – Vol. 336, no. 4. – Pp. 267–276. DOI: 10.1056/NEJM199701233360407
552. L'herminé-Coulomb, A. Fetal type IV glycogen storage disease: Clinical, enzymatic, and genetic data of a pure muscular form with variable and early antenatal manifestations in the same family / A. L'herminé-Coulomb, F. Beuzen, R. Bouvier [et al.] // *Am. J. Med. Genet. Part A.* – 2005. – Vol. 139A, no. 2. – Pp. 118–122. DOI: 10.1002/ajmg.a.30945
553. La Marca, G. Newborn screening for tyrosinemia type I: Further evidence that succinylacetone determination on blood spot is essential / G. La Marca, S. Malvagìa, E. Pasquini [et al.] // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2011. – Vol. 1. – Pp. 107–109. DOI: 10.1007/8904_2011_24
554. La Marca, G. The inclusion of succinylacetone as marker for tyrosinemia type I in expanded newborn screening programs / G. La Marca, S. Malvagìa, E. Pasquini [et al.] // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2008. – Vol. 22, no. 6. – Pp. 812–818. DOI: 10.1002/rcm.3428
555. Labbé, A. A new gel formulation of topical cysteamine for the treatment of corneal cystine crystals in cystinosis: The Cystadrops OCT-1 study / A. Labbé, C. Baudouin, G. Deschènes [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* – 2014. – Vol. 111, no. 3. – Pp. 314–320. DOI: 10.1016/j.ymgme.2013.12.298
556. Labrousse, P. Genetic heterozygosity and pseudodeficiency in the Pompe disease newborn screening pilot program / P. Labrousse, Y.H. Chien, R.J. Pomponio [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* – 2010. – Vol. 99, no. 4. – Pp. 379–383. DOI: 10.1016/j.ymgme.2009.12.014
557. Lachmann, R.H. Twin pairs showing discordance of phenotype in adult Gaucher's disease / R.H. Lachmann, I.R. Grant, D. Halsall, T.M. Cox // *QJM.* – 2004. – Vol. 97, no. 4. – Pp. 199–204. DOI: 10.1093/qjmed/hch036
558. Laforêt, P. Juvenile and adult-onset acid maltase deficiency in France: genotype-phenotype correlation /P. Laforêt, M. Nicolino, P.B. Eymard, [et al.] // *Neurology.* – 2000. – Vol. 55, no. 8. – Pp. 1122–1128. DOI: 10.1212/wnl.55.8.1122
559. Laforêt, P. The glycogen storage diseases and related disorders / P. Laforêt, D.A. Weinstein, G.P. A. Smit // *Saudubray J.-M. Inborn metabolic diseases: diagnosis and treatment / J.-M. Saudubray, G. van den Berghe, J.H. Walter (Eds.).* – 5th ed. – Berlin-Heidelberg: Springer, 2012. – Pp. 115–140.
560. Lakdawala, N.K. Familial Dilated Cardiomyopathy Caused by an Alpha-Tropomyosin Mutation. The Distinctive Natural History of Sarcomeric Dilated Cardiomyopathy / N.K. Lakdawala, L. Dellefave, C.S. Redwood [et al.] // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2010. – Vol. 55, no. 4. – Pp. 320–329. DOI: 10.1016/j.jacc.2009.11.017
561. Lamperti, C. Neuropathological study of skeletal muscle, heart, liver, and brain in a neonatal form of glycogen storage disease type IV associated with a new mutation in GBE1 gene /C. Lamperti, S. Salani, S. Lucchiari [et al.] // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2009. – Vol. 32 (Suppl 1). – Pp. S161–S168. DOI: 10.1007/s10545-009-1134-8
562. Landstrom, A.P. Mutations in JPH2-encoded junctophilin-2 associated with hypertrophic cardiomyopathy in humans / A.P. Landstrom, N. Weisleder,



- K.B. Batalden [et al.] // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2007. – Vol. 42, no. 6. – Pp. 1026–1035. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2007.04.006
563. Landstrom, A.P. Mutation type is not clinically useful in predicting prognosis in hypertrophic cardiomyopathy / A.P. Landstrom, M.J. Ackerman // *Circulation.* – 2010. – Vol. 122, no. 23. – Pp. 2441–2449. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.954446
564. Lapunzina, P. Identification of a frameshift mutation in osterix in a patient with recessive osteogenesis imperfecta / P. Lapunzina, M. Aglan, S. Temtamy [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2010. – Vol. 87, no. 1. – Pp. 110–114. DOI: 10.1016/j.ajhg.2010.05.016
565. László, A. The fate of tyrosinaemic Hungarian patients before the NTBC aera / A. László, M. Rózsa, E. Sallay [et al.] // *Ideggyogy. Sz.* – 2013. – Vol. 66, no. 11–12. – Pp. 415–419.
566. Lavalle, L. Phenotype and biochemical heterogeneity in late onset Fabry disease defined by N215S mutation / L. Lavalle, A.S. Thomas, B. Beaton [et al.] // *PLoS One.* – 2018. – Vol. 13, no. 4, e0193550. DOI: 10.1371/journal.pone.0193550
567. Lavieu, G. Regulation of autophagy by sphingosine kinase 1 and its role in cell survival during nutrient starvation / G. Lavieu, F. Scarlatti, G. Sala [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol. 281, no. 13. – Pp. 8518–8527. DOI:10.1074/jbc.M506182200
568. Le, T. First Aid for the USMLE. Step 1. 2012/ T. Le, V. Bhushan, J. Hofmann. – 22nd ed. – McGraw-Hill Medical, 2011. – P. 117.
569. Lee, J.H. Genetic basis of congenital and infantile nephrotic syndromes / J.H. Lee, K.H. Han, H. Lee [et al.] // *Am. J. Kidney Dis.* – 2011. – Vol. 58, no. 6. – Pp. 1042–1043. DOI: 10.1053/j.ajkd.2011.09.007
570. Lee, T.M. Pediatric cardiomyopathies / T.M. Lee, D.T. Hsu, P. Kantor[et al.] // *Circ. Res.* – 2017. – Vol. 121, no. 7. – Pp. 855–873. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309386
571. Lee-Chen, G.J. Mucopolysaccharidosis type I: Identification of novel mutations that cause Hurler/Scheie syndrome in Chinese families / G.J. Lee-Chen, T.R. Wang // *J. Med. Genet.* – 1997. – Vol. 34, no. 11. – Pp. 939–941. DOI:10.1136/jmg.34.11.939
572. Lenders, M. Multifocal White Matter Lesions Associated with the D313Y Mutation of the α -Galactosidase A Gene /M. Lenders, T. Duning, M. Schelleckes [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8, no. 2, e55565. DOI: 10.1371/journal.pone.0055565
573. Li, P. Molecular basis of iduronate-2-sulphatase gene mutations in patients with mucopolysaccharidosis type II Hunter syndrome / P. Li, A.B. Bellows, J.N. Thompson // *J. Med. Genet.* – 1999. – Vol. 36, no. 1. – Pp. 21–27. DOI: 10.1136/jmg.36.1.21
574. Li, S.C. Association of the congenital neuromuscular form of glycogen storage disease type IV with a large deletion and recurrent frameshift mutation / S.C. Li, W.L. Hwu, J.L. Lin,[et al.] // *J. Child Neurol.* – 2012. – Vol. 27, no. 2. – Pp. 204–208. DOI: 10.1177/0883073811415107
575. Li, Y. Direct multiplex assay of lysosomal enzymes in dried blood spots for newborn screening/ Y.Li, C.R. Scott, N.A. Chamoles [et al.] // *Clin. Chem.* – 2004. – Vol. 50, no. 10. – Pp. 1785–1796. DOI: 10.1373/clinchem.2004.035907
576. Li, D. Identification of novel mutations in RBM20 in patients with dilated cardiomyopathy /D.Li, A.Morales, J.Gonzalez-Quintana [et al.] // *Clin. Transl. Sci.* – 2010. – Vol. 3, no. 3. – Pp. 90–97. DOI: 10.1111/j.1752-8062.2010.00198.x

577. Li, F. Pigment epithelium-derived factor enhances differentiation and mineral deposition of human mesenchymal stem cells / F. Li, N. Song, J. Tombran-Tink, C. Niyibizi // *Stem Cells*. – 2013. – Vol. 31, no. 12. – Pp. 2714–2723. DOI: 10.1002/stem.1505
578. Li, J. Effects of β -blocker therapy on electrocardiographic and echocardiographic characteristics of left ventricular noncompaction / J. Li, J. Franke, R. Pribe-Wolferts [et al.] // *Clin. Res. Cardiol.* – 2015. – Vol. 104, no. 3. – Pp. 241–249. DOI: 10.1007/s00392-014-0778-z
579. Lignac, G.O. E. ÜberStörung des CystinstoffwechselsbeiKindern/ G.O. E. Lignac // *Dtsch. Arch. klin. Med.* – 1924. – No. 145. – Pp. 139.
580. Lin, C.Y. Pompe's disease in Chinese and prenatal diagnosis by determination of α -glucosidase activity /C.Y. Lin, B. Hwang, K.J. Hsiao, Y.R. Jin // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 1987. – Vol. 10, no. 1. – Pp. 11–17. DOI: 10.1007/BF01799482
581. Lin, H.Y. Genotype and phenotype analysis of Taiwanese patients with osteogenesis imperfecta / H.Y. Lin, C.K. Chuang, Y.N. Su [et al.] // *Orphanet J. Rare Dis.* – 2015. – Vol. 10, no. 1, art. num. 152. – 8 p. DOI: 10.1186/s13023-015-0370-2
582. Lin, H.Y. High incidence of the cardiac variant of fabry disease revealed by newborn screening in the Taiwan Chinese population /H.Y. Lin, K.W. Chong, J.H. Hsu [et al.] // *Circ. Cardiovasc. Genet.* – 2009. – Vol. 2, no. 5. – Pp. 450–456. DOI: 10.1161/CIRCGENETICS.109.862920
583. Linari, S. Clinical manifestations and management of Gaucher disease /S. Linari, G. Castaman // *Clin. Cases Miner. Bone Metab.* – 2015. – Vol. 12, no. 2. – Pp. 157–164. DOI: 10.11138/CCMBM/2015.12.2.157
584. Lindahl, K. COL1 C-propeptide cleavage site mutations cause high bone mass osteogenesis imperfecta /K.Lindahl, A.M. Barnes, N. Fratzl-Zelman [et al.] // *Hum. Mutat.* – 2011. – Vol. 32, no. 6. – Pp. 598–609. DOI: 10.1002/humu.21475
585. Lindahl, K. Genetic epidemiology, prevalence, and genotype-phenotype correlations in the Swedish population with osteogenesis imperfecta / K. Lindahl, E.Äström, C.J. Rubin [et al.] // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2015. – Vol. 23, no. 8. – Pp. 1042–1050. DOI: 10.1038/ejhg.2015.81
586. Lindblad, B. On the enzymic defects in hereditary tyrosinemia / B. Lindblad, S. Lindstedt, G. Steen // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1977. – Vol. 74, no. 10. – Pp. 4641–4645. DOI: 10.1073/pnas.74.10.4641
587. Lindert, U. MBTPS2 mutations cause defective regulated intramembrane proteolysis in X-linked osteogenesis imperfecta / U.Lindert, W.A. Cabral, S.Ausavarat[et al.] // *Nat. Commun.* – 2016. – No. 7,art.num. 11920. – 12 p. DOI: 10.1038/ncomms11920
588. Lionel, A.C. Improved diagnostic yield compared with targeted gene sequencing panels suggests a role for whole-genome sequencing as a first-tier genetic test / A.C. Lionel, G.Costain, N.Monfared [et al.] // *Genet. Med.* – 2018. – Vol. 20, no. 4. – Pp. 435–443. DOI: 10.1038/gim.2017.119
589. Liouville, I. Retrecissement cardiaque sous-aortique / I. Liouville // *Gazette de Medicine (Paris)*. –1869. – No. 24. – Pp. 161–163.
590. Lipshultz, S.E. The incidence of pediatric cardiomyopathy in two regions of the United States / S.E. Lipshultz, L.A. Sleeper, J.A. Towbin [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2003. – Vol. 348, no. 17. – Pp. 1647–1655. DOI: 10.1056/NEJMoa021715

591. Lipska, B.S. Genetic screening in adolescents with steroid-resistant nephrotic syndrome / B.S. Lipska, P.Iatropoulos, R.Maranta [et al.] // *Kidney Int.* – 2013. – Vol. 84, no. 1. – Pp. 206–213. DOI: 10.1038/ki.2013.93
592. Liu, G.S. A novel human R25C-phospholamban mutation is associated with super-inhibition of calcium cycling and ventricular arrhythmia / G.S. Liu, A. Morales, E.Vafiadaki [et al.] // *Cardiovasc. Res.* – 2015. – Vol. 107, no. 1. – Pp. 164–174. DOI: 10.1093/cvr/cvv127
593. Liu, Y. Gene mutation spectrum and genotype-phenotype correlation in a cohort of Chinese osteogenesis imperfecta patients revealed by targeted next generation sequencing / Y.Liu, Asan, D.Ma [et al.] // *Osteoporos. Int.* – 2017. – Vol. 28, no. 10. – Pp. 2985–2995. DOI: 10.1007/s00198-017-4143-8
594. Livanova, N.B. Pyridoxal 5'-phosphate as a catalytic and conformational cofactor of muscle glycogen phosphorylase B / N.B. Livanova, N.A. Chebotareva, T.B. Eronina, B.I. Kurganov // *Biochemistry (Moscow)*. – 2002. – Vol. 67, no. 10. – Pp. 1089–1998. DOI: 10.1023/a:1020978825802
595. Lo, S.M. Phenotype diversity in type 1 Gaucher disease: Discovering the genetic basis of Gaucher disease/hematologic malignancy phenotype by individual genome analysis / S.M. Lo, M.Choi, J. Liu, [et al.] // *Blood.* – 2012. – Vol. 119, no. 20. – Pp. 4731–4740. DOI: 10.1182/blood-2011-10-386862
596. Lofiego, C. Wide spectrum of presentation and variable outcomes of isolated left ventricular non-compaction / C.Lofiego, E.Biagini, F.Pasquale [et al.] // *Heart.* – 2007. – Vol. 93, no. 1. – Pp. 65–71. DOI: 10.1136/hrt.2006.088229
597. Lopes, L.R. Genetic complexity in hypertrophic cardiomyopathy revealed by high-throughput sequencing / L.R. Lopes, A.Zekavati, P. Syrris [et al.] // *J. Med. Genet.* – 2013. – Vol. 50, no. 4. – Pp. 228–239. DOI: 10.1136/jmedgenet-2012-101270
598. Löscher, W.N. Pompe disease in Austria: clinical, genetic and epidemiological aspects / W.N. Löscher, M.Huemer, T.M. Stulnig [et al.] // *J. Neurol.* – 2018. – Vol. 265, no. 1. – Pp. 159–164. DOI: 10.1007/s00415-017-8686-6
599. Lovric, S. Genetic testing in steroid-resistant nephrotic syndrome: when and how? / S.Lovric, S.Ashraf, W. Tan, F.Hildebrandt // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2016. – Vol. 31, no. 11. – Pp. 1802–1813. DOI: 10.1093/ndt/gfv355
600. Lovric, S. Rapid detection of monogenic causes of childhood-onset steroid-resistant nephrotic syndrome / S.Lovric, H.Fang, V.Vega-Warner [et al.] // *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* – 2014. – Vol. 9, no. 6. – Pp. 1109–1116. DOI: 10.2215/CJN.09010813
601. Lowe, E.D. The crystal structure of a phosphorylase kinase peptide substrate complex: kinase substrate recognition / E.D. Lowe, M.E. Noble, V.T. Skamnaki, [et al.] // *EMBO J.* – 1997. – Vol. 16, no. 22. – Pp. 6646–6658. DOI: 10.1093/emboj/16.22.6646
602. Lu, J.Z. Expression in CHO cells and pharmacokinetics and brain uptake in the Rhesus monkey of an IgG-iduronate-2-sulfatase fusion protein / J.Z. Lu, R.J. Boado, E.K. W. Hui [et al.] // *Biotechnol. Bioeng.* – 2011. – Vol. 108, no. 8. – Pp. 1954–1964. DOI: 10.1002/bit.23118
603. Lualdi, S. Characterization of iduronate-2-sulfatase gene-pseudogene recombinations in eight patients with mucopolysaccharidosis type II revealed by a rapid PCR-based method / S.Lualdi, S.Regis, M. Di Rocco [et al.] // *Hum. Mutat.* – 2005. – Vol. 25, no. 5. – Pp. 491–497. DOI: 10.1002/humu.20165

604. Lucchiari, S. Molecular characterisation of GSD III subjects and identification of six novel mutations in AGL /S. Lucchiari, M.A. Donati, R. Parini [et al.] // *Hum. Mutat.* – 2002. – Vol. 20, no. 6. – P. 480. DOI: 10.1002/humu.9093
605. Lucky, A.W. Endocrine studies in cystinosis: compensated primary hypothyroidism/ A.W. Lucky, P.M. Howley, K. Megyesi [et al.] // *J. Pediatr.* – 1977. – Vol. 91, no. 2. – Pp. 204–210. DOI: 10.1016/s0022-34767780813-5
606. Lukas, J. Functional and Clinical Consequences of Novel α -Galactosidase A Mutations in Fabry Disease / J. Lukas, S. Scalia, S. Eichler [et al.] // *Hum. Mutat.* – 2016. – Vol. 37, no. 1. – Pp. 43–51. DOI: 10.1002/humu.22910
607. Lukas, J. Functional characterisation of α -galactosidase a mutations as a basis for a new classification system in Fabry disease / J. Lukas, A.K. Giese, A. Markoff [et al.] // *PLoS Genet.* – 2013. – Vol. 9, no. 8, e1003632. – 10 p. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003632
608. Lysosomal storage disease : Wikipedia. The free encyclopedia. – Available at: https://en.wikipedia.org/wiki/Lysosomal_storage_disease.
609. Ma, H. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos / H.Ma, N. Marti-Gutierrez, S.W. Park [et al.] // *Nature.* – 2017. – Vol. 548. – Pp. 413–419. DOI: 10.1038/nature23305
610. Ma, J. Twenty-one novel mutations identified in the COL4A5 gene in Chinese patients with X-linked Alport's syndrome confirmed by skin biopsy / J. Ma, X. Pan, Z. Wang [et al.] // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2011. – Vol. 26, no. 12. – Pp. 4003–4010. DOI: 10.1093/ndt/gfr184
611. Machuca, E. Clinical and epidemiological assessment of steroid-resistant nephrotic syndrome associated with the NPHS2 R229Q variant /E. Machuca, A. Hummel, F. Nevo [et al.] // *Kidney Int.* – 2009. – Vol. 75, no. 7. – Pp. 727–735. DOI: 10.1038/ki.2008.650
612. Machuca, E. Genotype-phenotype correlations in non-Finnish congenital nephrotic syndrome / E. Machuca, G. Benoit, F. Nevo [et al.] // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2010. – Vol. 21, no. 7. – Pp. 1209–1217. DOI: 10.1681/ASN.2009121309
613. Magoulas, P.L. Diffuse reticuloendothelial system involvement in type IV glycogen storage disease with a novel GBE1 mutation: A case report and review / P.L. Magoulas, A.W. El-Hattab, A. Roy [et al.] // *Hum. Pathol.* – 2012. – Vol. 43, no. 6. – Pp. 943–951. DOI: 10.1016/j.humpath.2011.10.001
614. Magoulas, P.L. Glycogen storage disease type IV / P.L. Magoulas, A.W. El-Hattab // *GeneReviews* [Internet] / M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon [et al.] (Eds.). – Seattle (WA): University of Washington, 1993–2020. – 2013 [updated Aug 1, 2019]. – Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23285490/>.
615. Maichele, A.J. Mutations in the testis/liver isoform of the phosphorylase kinase γ subunit (PHKG2) cause autosomal liver glycogenosis in the gsd rat and in humans / A.J. Maichele, B. Burwinkel, I. Maire [et al.] // *Nat. Genet.* – 1996. – Vol. 14. – Pp. 337–340. DOI: 10.1038/ng1196-337
616. Maiese, K. *Molecules to Medicine with mTOR: Translating Critical Pathways into Novel Therapeutic Strategies* / K. Maiese (Ed.). – 1st ed. –Academic Press Book, 2016. – 472 p. ISBN: 9780128027332, 9780128027554
617. Maksimova, N.R. A novel homozygousmutation causing hereditary tyrosinemia type I in Yakut patient in Russia: case report / N.R. Maksimova, E.E. Gurinova, A.L. Sukhomyasova [et al.] // *Wiad. Lek.* –2016. – Vol. 69, no. 2 (Pt 2). – Pp. 295–298.



618. Malfait, F. Helical mutations in type I collagen that affect the processing of the amino-propeptide result in an Osteogenesis Imperfecta/Ehlers-Danlos Syndrome overlap syndrome / F. Malfait, S. Symoens, N. Goemans [et al.] // *Orphanet J. Rare Dis.* – 2013. – Vol. 8, no. 1. – Pp. 78. DOI: 10.1186/1750-1172-8-78
619. Malfait, F. Total absence of the alpha2(I) chain of collagen type I causes a rare form of Ehlers-Danlos syndrome with hypermobility and propensity to cardiac valvular problems / F. Malfait, S. Symoens, P. Coucke [et al.] // *J. Med. Genet.* – 2006. – Vol. 43, no. 7, art. num. e36. DOI: 10.1136/jmg.2005.038224
620. Malone, A.F. Rare hereditary COL4A3/COL4A4 variants may be mistaken for familial focal segmental glomerulosclerosis / A.F. Malone, P.J. Phelan, G. Hall [et al.] // *Kidney Int.* – 2014. – Vol. 86, no. 6. – Pp. 1253–1259. DOI: 10.1038/ki.2014.305
621. Manwaring, V. Urine analysis of glucose tetrasaccharide by HPLC; A useful marker for the investigation of patients with Pompe and other glycogen storage diseases / V. Manwaring, H. Prunty, K. Bainbridge [et al.] // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2012. – Vol. 35, no. 2. – Pp. 311–316. DOI: 10.1007/s10545-011-9360-2
622. Manz, F. Progression of chronic renal failure in a historical group of patients with nephropathic cystinosis / F. Manz, N. Gretz // *Pediatr. Nephrol.* – 1994. – Vol. 8, no. 4. – Pp. 466–471. DOI: 10.1007/BF00856532
623. Manzia, T.M. Glycogen storage disease type Ia and VI associated with hepatocellular carcinoma: two case reports / T.M. Manzia, R. Angelico, L. Toti [et al.] // *Transplant. Proc.* – 2011. – Vol. 43, no. 4. – Pp. 1181–1183. DOI: 10.1016/j.transproceed.2011.01.129
624. Marcolongo, P. Structure and mutation analysis of the glycogen storage disease type 1b gene / P. Marcolongo, V. Barone, G. Priori [et al.] // *FEBS Lett.* – 1998. – Vol. 436, no. 2. – Pp. 247–250. DOI: 10.1016/S0014-57939801129-6
625. Marcus, F.I. Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: proposed modification of the Task Force Criteria / F.I. Marcus, W.J. McKenna, D. Sherrill [et al.] // *Eur. Heart J.* – 2010. – Vol. 31, no. 7. – Pp. 806–814. DOI: 10.1093/eurheartj/ehq025
626. Marian, A.J. Pathogenesis of diverse clinical and pathological phenotypes in hypertrophic cardiomyopathy / A.J. Marian // *Lancet.* – 2000. – Vol. 355, no. 9197. – Pp. 58–60. DOI: 10.1016/S0140-6736(99)06187-5
627. Marini, J.C. Consortium for osteogenesis imperfecta mutations in the helical domain of type I collagen: Regions rich in lethal mutations align with collagen binding sites for integrins and proteoglycans / J.C. Marini, A. Forlino, W.A. Cabral [et al.] // *Hum. Mutat.* – 2007. – Vol. 28, no. 3. – Pp. 209–221. DOI: 10.1002/humu.20429
628. Marini, J.C. New genes in bone development: What's new in osteogenesis imperfecta / J.C. Marini, A.R. Blissett // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2013. – Vol. 98, no. 8. – Pp. 3095–3103. DOI: 10.1210/jc.2013-1505
629. Markello, T.C. Improved Renal Function in Children with Cystinosis Treated with Cysteamine / T.C. Markello, I.M. Bernardini, W.A. Gahl // *N. Engl. J. Med.* – 1993. – Vol. 328, no. 16. – Pp. 1157–1162. DOI: 10.1056/NEJM199304223281604
630. Maron, B.J. Double or compound sarcomere mutations in hypertrophic cardiomyopathy: A potential link to sudden death in the absence of conventional risk factors / B.J. Maron, M.S. Maron, C. Semsarian // *Hear. Rhythm.* – 2012. – Vol. 9, no. 1. – Pp. 57–63. DOI: 10.1016/j.hrthm.2011.08.009

631. Maron, B.J. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: An American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention / B.J. Maron, J.A. Towbin, G. Thiene [et al.] // *Circulation*. – 2006. – Vol. 113, no. 14. – Pp. 1807–1816. DOI: 10.1161/circulationaha.106.174287
632. Maron, B.J. Hypertrophic cardiomyopathy: A systematic review / B.J. Maron // *J. Am. Med. Assoc.* – 2002. – Vol. 287, no. 10. – Pp. 1308–1320. DOI: 10.1001/jama.287.10.1308
633. Maron, B.J. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults: Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA study / B.J. Maron, J.M. Gardin, J.M. Flack [et al.] // *Circulation*. – 1995. – Vol. 92, no. 4. – Pp. 785–789. DOI: 10.1161/01.CIR.92.4.785
634. Maron, B.J. Sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy / B.J. Maron, L. Fananapazir // *Circulation*. – 1992. Vol. 85, no. 1 (Suppl I). – Pp. I57–I63.
635. Marti, B. Wormian bones in a general paediatric population / B. Marti, D. Sirinelli, L. Maurin, E. Carpentier // *Diagn. Interv. Imaging*. – 2013. – Vol. 94, no. 4. – Pp. 428–432. DOI: 10.1016/j.diii.2013.01.001
636. Martin, R. Recognition and diagnosis of mucopolysaccharidosis II Hunter syndrome / R. Martin, M. Beck, C. Eng [et al.] // *Pediatrics*. – 2008. – Vol. 121, no. 2. – Pp. 377–386. DOI: 10.1542/peds.2007-1350
637. Martínez-Glez, V. Identification of a mutation causing deficient BMP1/mTLD proteolytic activity in autosomal recessive osteogenesis imperfecta / V. Martínez-Glez, M. Valencia, J.A. Caparros-Martín [et al.] // *Hum. Mutat.* – 2012. – Vol. 33, no. 2. – Pp. 343–350. DOI: 10.1002/humu.21647
638. Martiniuk, F. Carrier frequency for glycogen storage disease type II in New York and estimates of affected individuals born with the disease / F. Martiniuk, A. Chen, A. Mack [et al.] // *Am. J. Med. Genet.* – 1998. – Vol. 79, no. 1. – Pp. 69–72. DOI: 10.1002/SICI1096-8628(199808)79:1<69::AID-AJMG16>3.0.CO;2-K
639. Martins, A.M. Inborn errors of metabolism: a clinical overview / A.M. Martins // *Sao Paulo Med. J.* – 1999. – Vol. 117, no. 6. – Pp. 251–265. DOI: 10.1590/S1516-31801999000600006
640. Maruyama, H. Correction: Effectiveness of plasma lyso-Gb3 as a biomarker for selecting high-risk patients with Fabry disease from multispecialty clinics for genetic analysis / H. Maruyama, K. Miyata, M. Mikame [et al.] // *Genet. Med.* – 2019 (May). – Vol. 21, no. 5. – P. 1263. DOI: 10.1038/s41436-019-0447-8
641. Mashima, R. Enzyme activities of α -glucosidase in Japanese neonates with pseudodeficiency alleles / R. Mashima, T. Okuyama // *Mol. Genet. Metab. Rep.* – 2017. – Vol. 12. – Pp. 110–114. DOI: 10.1016/j.ymgmr.2017.06.007
642. Matern, D. Glycogen storage disease type I: Diagnosis and phenotype/genotype correlation / D. Matern, H.H. Seydewitz, D. Bali, [et al.] // *Eur. J. Pediatr. Suppl.* – 2002. – Vol. 161 (Suppl 1). – Pp. S10–S19. DOI: 10.1007/s00431-002-0998-5
643. Matern, D. Newborn screening for lysosomal storage disorders / D. Matern // *Acta Paediatr.* – 2008. – Vol. 97, no. 457. – Pp. 33–37. DOI: 10.1111/j.1651-2227.2008.00652.x



644. McCartan, C. Cardiomyopathy Classification: Ongoing Debate in the Genomics Era / C. McCartan, R. Mason, S.R. Jayasinghe [et al.] // *Biochem. Res. Int.* – 2012. – Vol. 2012, Art. ID 796926. – 10 p. DOI: 10.1155/2012/796926
645. McCarthy, H.J. Simultaneous Sequencing of 24 Genes Associated with Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome / H.J. McCarthy, A. Bierzynska, M. Wherlock [et al.] // *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* – 2013. – Vol. 8, no. 4. – Pp. 637–648. DOI: 10.2215/CJN.07200712
646. McNeill, A. A clinical and family history study of Parkinson's disease in heterozygous glucocerebrosidase mutation carriers / A. McNeill, R. Duran, D.A. Hughes [et al.] // *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* – 2012. – Vol. 83, no. 8. – Pp. 853–854. DOI: 10.1136/jnnp-2012-302402
647. McTaggart, S.J. Childhood urinary conditions / S.J. McTaggart // *Aust. Fam. Physician.* – 2005 – Vol. 34, no. 11. – Pp. 937–941.
648. McTaggart, S.J. Clinical spectrum of Denys-Drash and Frasier syndrome / S.J. McTaggart, E. Algar, C.W. Chow [et al.] // *Pediatr. Nephrol.* – 2001. – Vol. 16, no. 4. Pp. 335–339. DOI: 10.1007/s004670000541
649. Meaney, C.A nonsense mutation (R220X) in the alpha-galactosidase A gene detected in a female carrier of Fabry disease / C. Meaney, L.C. Blanch, C.P. Morris // *Hum. Mol. Genet.*–1994. – Vol. 3, no. 6. – Pp. 1019–1020. DOI: 10.1093/hmg/3.6.1019
650. Mechtler, T.P. Neonatal screening for lysosomal storage disorders: feasibility and incidence from a nationwide study in Austria / T.P. Mechtler, S. Stary, T.F. Metz [et al.] // *Lancet.* – 2012. – Vol. 379, no. 9813. – Pp. 335–341. DOI: 10.1016/S0140-6736(11)61266-X
651. Mehta, A. Epidemiology and natural history of Gaucher's disease / A. Mehta // *Eur. J. Intern. Med.* – 2006. – Vol.17 (Suppl). – Pp. S2–S5. DOI: 10.1016/j.ejim.2006.07.005
652. Mehta, A. Natural course of Fabry disease: changing pattern of causes of death in FOS – Fabry Outcome Survey / A. Mehta, J.T. Clarke, R. Giugliani [et al.] // *J. Med. Genet.* – 2009. – Vol. 46, no. 8. – Pp. 548–552. DOI: 10.1136/jmg.2008.065904
653. Mehta, A. Fabry Disease / A. Mehta, D. Hughes // *GeneReviews*[®] [Internet] / M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon [et al.] (Eds.). – Seattle (WA): University of Washington, 1993–2020. – 2013 [updated Jan 5, 2017]. – Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1292/>.
654. Meikle, P.J. Newborn screening for lysosomal storage disorders / P.J. Meikle, D.J. Grasby, C.J. Dean [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* – 2006. – Vol. 88, no. 4. – Pp. 307–314. DOI: 10.1016/j.ymgme.2006.02.013
655. Meikle, P.J. Prevalence of lysosomal storage disorders / P.J. Meikle, J.J. Hopwood, A.E. Clague [et al.] // *JAMA.* – 1999. – Vol. 281, no. 3. – Pp. 249–254. DOI: 10.1001/jama.281.3.249
656. Mekahli, D. Long-term outcome of idiopathic steroid-resistant nephrotic syndrome: a multicenter study / D. Mekahli, A. Liutkus, B. Ranchin [et al.] // *Pediatr. Nephrol.* – 2009. – Vol. 24, no. 8. – Pp. 1525–1532. DOI: 10.1007/s00467-009-1138-5
657. Melendez, R. The fractal structure of glycogen: a clever solution to optimize cell metabolism / R. Melendez, E. Melendez-Hevia, E.I. Canela // *Biophys. J.* – 1999. – Vol. 77, no. 3. – Pp. 1327–1332. DOI: 10.1016/S0006-3495(99)76982-1

658. Melis, D. Genotype/phenotype correlation in glycogen storage disease type 1b: a multicentre study and review of the literature / D. Melis, R. Fulceri, G. Parenti [et al.] // *Eur. J. Pediatr.* – 2005. – Vol. 164, no. 8. – Pp. 501–508. DOI: 10.1007/s00431-005-1657-4
659. Melis, D. Impaired bone metabolism in glycogen storage disease type I is associated with poor metabolic control in type Ia and with granulocyte-colony stimulating factor therapy in type Ib / D. Melis, R. Pivonello, M. Cozzolino [et al.] // *Horm. Res. Paediatr.* – 2014. – Vol. 81, no. 1. – Pp. 55–62. DOI: 10.1159/000351022
660. Melis, D. Myasthenia gravis in a patient affected by glycogen storage disease type 1b: a further manifestation of an increased risk for autoimmune disorders? / D. Melis, F. Balivo, R. Della Casa [et al.] // *J. Inher. Metab. Dis.* – 2008. – Vol. 31 (Suppl 2). – Pp. S227–S231. DOI: 10.1007/s10545-008-0810-4
661. Mendoza-Londono, R. Recessive osteogenesis imperfecta caused by missense mutations in SPARC / R. Mendoza-Londono, S. Fahiminiya, J. Majeovski [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2015. – Vol. 96, no. 6. – Pp. 979–985. DOI: 10.1016/j.ajhg.2015.04.021
662. Meng, L. Use of Exome Sequencing for Infants in Intensive Care Units: Ascertainment of Severe Single-Gene Disorders and Effect on Medical Management / L. Meng, M. Pammi, A. Saronwala [et al.] // *JAMA. Pediatr.* – 2017. – Vol. 171, no. 12, e173438. – 10 p. DOI: 10.1001/jamapediatrics
663. Menon, S. Cardiac troponin T mutation in familial cardiomyopathy with variable remodeling and restrictive physiology / S. Menon, V. Michels, P. Pellikka [et al.] // *Clin. Genet.* – 2008. – Vol. 74, no. 5. – Pp. 445–454. DOI: 10.1111/j.1399-0004.2008.01062.x
664. Metz, T.F. Evaluation of a novel, commercially available mass spectrometry kit for newborn screening including succinylacetone without hydrazine / T.F. Metz, T.P. Mechtler, M. Merk [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* – 2012. – Vol. 413, no. 15–16. – Pp. 1259–1264. DOI: 10.1016/j.cca.2012.04.007
665. Michelakakis, H. Characterization of glucocerebrosidase in Greek Gaucher disease patients: Mutation analysis and biochemical studies / H. Michelakakis, E. Dimitriou, S. Vanweely [et al.] // *J. Inher. Metab. Dis.* – 1995. – Vol. 18, no. 5. – Pp. 609–615. DOI: 10.1007/bf02436006
666. Michelakakis, H. Homozygosity for the double D409H+H255Q allele in type II Gaucher disease / H. Michelakakis, M. Moraitou, E. Dimitriou [et al.] // *J. Inher. Metab. Dis.* – 2006. – Vol. 29, no. 4. – P. 591. DOI: 10.1007/s10545-006-0316-x
667. Middleton, R. Cystinosis. A clinicopathological conference. “From toddlers to twenties and beyond” Adult-Paediatric Nephrology Interface Meeting, Manchester 2001 / R. Middleton, M. Bradbury, N. Webb [et al.] // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2003. – Vol. 18, no. 12. – Pp. 2492–2495. DOI: 10.1093/ndt/gfg445
668. Mignot, C. Perinatal-lethal Gaucher disease / C. Mignot, A. Gelot, B. Bessieres [et al.] // *Am. J. Med. Genet.* – 2003. – Vol. 120A, no. 3. – Pp. 338–344. DOI: 10.1002/ajmg.a.20117
669. Millat, G. Development of a high resolution melting method for the detection of genetic variations in hypertrophic cardiomyopathy / G. Millat, V. Chanavat, H. Créhalet, [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* – 2010. – Vol. 411, no. 23–24. – Pp. 1983–1891. DOI: 10.1016/j.cca.2010.08.017
670. Miller, E.M. Uptake of cardiac screening and genetic testing among hypertrophic and dilated cardiomyopathy families / E.M. Miller, Y. Wang, S.M. Ware // *J. Genet. Couns.* – 2013. – Vol. 22, no. 2. – Pp. 258–267. DOI: 10.1007/s10897-012-9544-4

671. Mills, K. Synthesis of novel internal standards for the quantitative determination of plasma ceramide trihexoside in Fabry disease by tandem mass spectrometry / K. Mills, A. Johnson, B. Winchester // *FEBS. Lett.* – 2002. – Vol. 515, no. 1-3. – Pp. 171–176. DOI: 10.1016/s0014-5793(02)02491-2
672. Milting, H. The TMEM43 Newfoundland mutation p.S358L causing ARVC-5 was imported from Europe and increases the stiffness of the cell nucleus / H. Milting, B. Klauke, A.H. Christensen [et al.] // *Eur. Heart. J.* – 2015. – Vol. 36, no. 14. – Pp. 872–881. DOI: 10.1093/eurheartj/ehu077
673. Minarich, L.A. Bone mineral density in glycogen storage disease type Ia and Ib / L.A. Minarich, A. Kirpich, L.M. Fiske [et al.] // *Genet. Med.* – 2012. – Vol. 14, no. 8. – Pp. 737–741. DOI: 10.1038/gim.2012.36
674. Miner, J.H. Pathology vs. molecular genetics: (re)defining the spectrum of Alport syndrome / J.H. Miner // *Kidney Int.* – 2014. – Vol. 86, no. 6. – Pp.1081–1083. DOI: 10.1038/ki.2014.326
675. Mirchandani, S. Sudden cardiac death: a 2400-year-old diagnosis? / S. Mirchandani, C.K. Phoon // *Int. J. Cardiol.* – 2003. – Vol. 90, no. 1. – Pp. 41–48. DOI: 10.1016/s0167-5273(02)00517-x
676. Mitchell, G.A. Hypertyrosinemia / G.A. Mitchell, M. Grompe, M. Lambert, R.M. Tanguay // *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* / C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly [et al.] (Eds.). – 4 vol. set. – 8th ed. – New York: McGraw Hill, 2001. – Pp. 1777–1806.
677. Mochel, F. Adult polyglucosan body disease: Natural History and Key Magnetic Resonance Imaging Findings / F. Mochel, R. Schiffmann, M.E. Steenweg [et al.] // *Ann. Neurol.* – 2012. – Vol. 72, no. 3. – Pp. 433–441. DOI: 10.1002/ana.23598
678. 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 [et al.] // *Nephron.* – 2019. – Vol. 141, no. 4. – Pp. 249–255. DOI: 10.1159/000495886
679. Montini, G. Early coenzyme Q10 supplementation in primary coenzyme Q10 deficiency / G. Montini, C. Malaventura, L. Salviati // *N. Engl. J. Med.* – 2008. – Vol. 358, no. 26. – Pp. 2849–2850. DOI: 10.1056/NEJMc0800582
680. Mook, O.R. Targeted sequence capture and GS-FLX Titanium sequencing of 23 hypertrophic and dilated cardiomyopathy genes: implementation into diagnostics / O.R. Mook, M.A. Haagmans, J.F. Soucy [et al.] // *J. Med. Genet.* – 2013. – Vol. 50, no. 9. – Pp. 614–626. DOI: 10.1136/jmedgenet-2012-101231
681. Moore, D. The prevalence of and survival in Mucopolysaccharidosis I: Hurler, Hurler-Scheie and Scheie syndromes in the UK / D. Moore, M.J. Connock, E. Wraith [et al.] // *Orphanet J. Rare Dis.* – 2008. – No. 3, art. num. 24. – 7 p. DOI: 10.1186/1750-1172-3-24
682. Moosa, S. Autosomal-Recessive Mutations in MESD Cause Osteogenesis Imperfecta / S. Moosa, G.L. Yamamoto, L. Garbes [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2019. – Vol. 105, no. 4. – Pp. 836–843. DOI: 10.1016/j.ajhg.2019.08.008
683. Mörner, S. Identification of the genotypes causing hypertrophic cardiomyopathy in northern Sweden / S. Mörner, P. Richard, E. Kazzam [et al.] // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2003. – Vol. 35, no. 7. – Pp. 841–849. DOI: 10.1016/s0022-2828(03)00146-9

684. Moses, S.W. The variable presentations of glycogen storage disease type IV: a review of clinical, enzymatic and molecular studies / S.W. Moses, R. Parvari // *Curr. Mol. Med.* – 2002. – Vol. 2, no. 2. – Pp. 177–88. DOI: 10.2174/1566524024605815
685. Motas, S. CNS-directed gene therapy for the treatment of neurologic and somatic mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome) / S. Motas, V. Haurigot, M. Garcia [et al.] // *JCI Insight.* – 2016. – Vol. 1, no. 9, e86696. – 19 p. DOI: 10.1172/jci.insight.86696
686. MRC-Holland. – Available at: <http://www.mlpa.com>.
687. MSMS Products :NeoBase™ Non-derivatized MSMS kit. – Available at: https://newbornscreening.perkinelmer.com/products/msms_products/neobase_non-derivatized_msms_kit.
688. Muenzer, J. International Consensus Panel on Management and Treatment of Mucopolysaccharidosis I. Mucopolysaccharidosis I: management and treatment guidelines / J. Muenzer, J.E. Wraith, L.A/ Clarke // *Pediatrics.* – 2009. – Vol. 123, no. 1. – Pp. 19–29. DOI: 10.1542/peds.2008-0416
689. Mullally, M. Retrospective Evaluation of Clinical Practice: Using a Modified Cornstarch in the Management of Glycogen Storage Disease / M. Mullally, H. Mundy, M. Champion [et al.] // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2010. – Vol. 33 (Suppl 1). – P. S72.
690. Müller, K.B. Evaluation of a-iduronidase in dried blood spots is an accurate tool for mucopolysaccharidosis I diagnosis / K.B. Müller, V.G. Pereira, A.M. Martins [et al.] // *J. Clin. Lab. Anal.* – 2011. – Vol. 25, no. 4. – Pp. 251–254. DOI: 10.1002/jcla.20468
691. Mundada, V. Lumbar gibbus: early presentation of dysostosis multiplex / V. Mundada, N. D'Souza // *Arch. Dis. Child.* – 2009. – Vol. 94, no. 12. – Pp. 930–931. DOI: 10.1136/adc.2009.158014
692. Murphy, A.M. Incidence and prevalence of MPS I in the Irish Republic / A.M. Murphy, D. Lambert, E.P. Treacy [et al.] // *Arch. Dis. Child.*–2009. – Vol.94, no. 1. – Pp. 52–54. DOI: 10.1136/adc.2007.135772
693. Murphy, S.L. Evaluation of the Mayo Clinic Phenotype-Based Genotype Predictor Score in Patients with Clinically Diagnosed Hypertrophic Cardiomyopathy / S.L. Murphy, J.H. Anderson, J.D. Kapplinger [et al.] // *J. Cardiovasc. Transl. Res.* – 2016. – Vol. 9, no. 2. – Pp. 153–161.
694. Murugesan, V. Glucosylsphingosine is a key biomarker of Gaucher disease / V. Murugesan, W.L. Chuang, A. Lischuk [et al.] // *Am. J. Hematol.* – 2016. – Vol. 91, no. 11. – Pp. 1082–1089. DOI: 10.1002/ajh.24491
695. Nagral, A. Gaucher disease / A. Nagral // *J. Clin. Exp. Hepatol.* – 2014. – Vol. 4, no. 1. – Pp. 37–50. DOI: 10.1016/j.jceh.2014.02.005
696. Nakai, A. Uncooked cornstarch treatment for hepatic phosphorylase kinase deficiency / A. Nakai, Y. Shigematsu, T. Takano [et al.] // *Eur. J. Pediatr.* –1994. – Vol. 153, no. 8. – Pp. 581–583. DOI: 10.1007/bf02190663
697. Nakamura, T. Glucose-6-phosphatase gene mutations in 20 adult Japanese patients with glycogen storage disease type 1a with reference to hepatic tumors / T. Nakamura, T. Ozawa, T. Kawasaki [et al.] // *J. Gastroenterol. Hepatol.*–2001. – Vol. 16, no. 12. – Pp. 1402–1408. DOI: 10.1046/j.1440-1746.2001.02645.x
698. Nakanishi, K. Two-Year Outcome of the ISKDC Regimen and Frequent-Relapsing Risk in Children with Idiopathic Nephrotic Syndrome / K. Nakanishi, K. Iijima,

- K. Ishikura [et al.] // *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* – 2013. – Vol. 8, no. 5. – Pp. 756–762. DOI: 10.2215/CJN.09010912
699. Nakao, S. Fabry disease: detection of undiagnosed hemodialysis patients and identification of a “renal variant” phenotype / S. Nakao, C. Kodama, T. Takenaka [et al.] // *Kidney Int.* – 2003. – Vol. 64, no. 3. – Pp. 801–807. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2003.00160.x
700. Nalls, M.A. A multicenter study of glucocerebrosidase mutations in dementia with Lewy bodies / M.A. Nalls, R. Duran, G. Lopez [et al.] // *JAMA Neurol.* – 2013. – Vol. 70, no. 6. – Pp. 727–735. DOI: 10.1001/jamaneurol.2013.1925
701. 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 [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* – 2017. – Vol. 120, no. 1–2 (Suppl). – P. 101. DOI: 10.1016/j.ymgme.2016.11.254
702. 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 // *Eur. J. Pediatr.* – 2017. – Vol. 176, no. 10. – Pp. 1385–1391. DOI: 10.1007/s00431-017-2992-y
703. Nance, C.S. Later-onset Fabry disease: an adult variant presenting with the cramp-fasciculation syndrome / C.S. Nance, C.J. Klein, M. Banikazemi [et al.] // *Arch. Neurol.* – 2006. – Vol. 63, no. 3. – Pp. 453–457. DOI: 10.1001/archneur.63.3.453
704. Narisawa, K. A new variant of glycogen storage disease type I probably due to a defect in the glucose-6-phosphate transport system / K. Narisawa, Y. Igarashi, H. Otomo [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1978. – Vol. 83, no. 4. – Pp. 1360–1364. DOI: 10.1016/0006-291x(78)91371-2
705. Nascimbeni, A.C. Impaired autophagy contributes to muscle atrophy in glycogen storage disease type II patients / A.C. Nascimbeni, M. Fanin, E. Masiero [et al.] // *Autophagy.* – 2012. – Vol. 8, no. 11. – Pp. 1697–1700. DOI: 10.4161/auto.21691
706. Nascimbeni, A.C. Molecular pathology and enzyme processing in various phenotypes of acid maltase deficiency / A.C. Nascimbeni, M. Fanin, E. Tasca [et al.] // *Neurology.* – 2008. – Vol. 70, no. 8. – Pp. 617–626. DOI: 10.1212/01.wnl.0000299892.81127.8e
707. National Center for Biotechnology Information (NCBI). – Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> (accessed 05.12.2018).
708. National Gaucher Foundation. Gaucher Disease. – Available at: <https://www.gaucherdisease.org/>.
709. Nephrotic syndrome in children: prediction of histopathology from clinical and laboratory characteristics at time of diagnosis : A Report of the International Study of Kidney Disease in Children // *Kidney Int.* – 1978. Vol. 13, no. 2. – Pp. 159–165. DOI: 10.1038/ki.1978.23
710. Nesterova, G. Nephropathic cystinosis: late complications of a multisystemic disease / G. Nesterova, W. Gahl // *Pediatr. Nephrol.* – 2008. – Vol.23, no. 6. – Pp. 863–878. DOI: 10.1007/s00467-012-2242-5
711. Nesterova, G. Cystinosis / G. Nesterova, W.A. Gahl // *GeneReviews*^{*} [Internet] / M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon [et al.] (Eds.). – Seattle (WA): University of Washington, 1993–2020. – 2001 [updated Dec 7, 2017]. – Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1400/pdf/Bookshelf_NBK1400.pdf.

712. Nesterova, G. Cystinosis: the evolution of a treatable disease / G. Nesterova, W.A. Gahl // *Pediatr. Nephrol.* – 2013. – Vol. 28, no. 1. – Pp. 51–59. DOI: 10.1007/s00467-012-2242-5
713. Neufeld, E.F. Inherited disorders of lysosomal metabolism / E.F. Neufeld, T.W. Lim, L.J. Shapiro // *Ann. Rev. Biochem.* – 1975. – Vol. 44. – Pp. 357–376. DOI: 10.1146/annurev.bi.44.070175.002041
714. Neufeld, E.F. The Mucopolysaccharidoses / E.F. Neufeld, J. Muenzer // *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* / C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly [et al.] (Eds.). – 4 vol. set. – 8th ed. – New York: Mc Graw Hill, 2001. – Pp. 3421–3452.
715. Newborn screening quality assurance program. Lysosomal storage disorders proficiency testing program (LSDPT) : Quarterly Report / Centers for disease control and prevention; J. Mei, I. Williams (Eds.). – 2017 (quarter 1). – Vol. 6, no. 1. – 5 p. – Available at: http://www.cdc.gov/labstandards/nsqap_reports.html.
716. Newgard, C.B. Human brain glycogen phosphorylase – cloning, sequence analysis, chromosomal mapping, tissue expression, and comparison with the human liver and muscle isozymes / C.B. Newgard, D.R. Littman, C. van Genderen [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1988. – Vol. 263, no. 8. – Pp. 3850–3857.
717. Niaudet, P. Genetic forms of nephrotic syndrome / P. Niaudet // *Pediatr. Nephrol.* – 2004. – Vol. 19, no. 12. – Pp. 1313–1318. DOI: 10.1007/s00467-004-1676-9
718. Niaudet, P. Steroid-sensitive idiopathic nephrotic syndrome in children / P. Niaudet // *Pediatric Nephrology* / E.D. Avner, W.E. Harmon, P. Niaudet, N. Yoshikawa (Eds.). – 5th ed. – Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. – Chapter 27.
719. Niemann, M. Gene mutations versus clinically relevant phenotypes: lyso-Gb3 defines Fabry disease / M. Niemann, A. Rolfs, S. Störk [et al.] // *Circ. Cardiovasc. Genet.* – 2014. – Vol. 7, no. 1. – Pp. 8–16. DOI: 10.1161/CIRCGENETICS.113.000249
720. Niimura, H. Sarcomere protein gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy of the elderly / H. Niimura, K.K. Patton, W.J. McKenna [et al.] // *Circulation.* – 2002. – Vol. 105, no. 4. – Pp. 446–451. DOI: 10.1161/hc0402.102990
721. Niizawa, G. Retrospective diagnosis of glycogen storage disease type II by use of a newborn-screening card / G. Niizawa, C. Levin, C. Aranda [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* – 2005. – Vol. 359, no. 1–2. – Pp. 205–206. DOI: 10.1016/j.cccn.2005.04.007
722. Niño, M.Y. Extension of the Pompe mutation database by linking disease-associated variants to clinical severity / M.Y. Niño, S.L. M. in't Groen, A.J. Bergsma [et al.] // *Hum. Mutat.* – 2019. – Vol. 40, no. 11. – Pp. 1954–1967. DOI: 10.1002/humu.23854
723. Nishi, A. Biochemical and genetic analysis of the effects of amylose-extender mutation in rice endosperm / A. Nishi, Y. Nakamura, N. Tanaka [et al.] // *Plant. Physiol.* – 2001. – Vol. 127, no. 2. – Pp. 459–472.
724. Nishi, K. Detailed clinical manifestations at onset and prognosis of neonatal-onset Denys-Drash syndrome and congenital nephrotic syndrome of the Finnish type / K. Nishi, T. Inoguchi, K. Kamei [et al.] // *Clin. Exp. Nephrol.* – 2019. – Vol. 23, no. 8. – Pp. 1058–1065. DOI: 10.1007/s10157-019-01732-7
725. Nissenkorn, A. Carnitine-deficient myopathy as a presentation of tyrosinemia type I / A. Nissenkorn, S.H. Korman, O. Vardi [et al.] // *J. Child. Neurol.* – 2001. – Vol. 16, no. 9. – Pp. 642–644. DOI: 10.1177/088307380101600903

726. Nitisinone: new drug. Type 1 tyrosinemia: an effective drug // *Prescrire Int.* – 2007. – Vol. 16, no. 88. – Pp. 56–58.
727. Nolte, K.W. Congenital type IV glycogenosis: the spectrum of pleomorphic polyglucosan bodies in muscle, nerve, and spinal cord with two novel mutations in the GBE1 gene / K.W. Nolte, A.R. Janecke, M. Vorgerd [et al.] // *Acta. Neuropathol.* – 2008. – Vol. 116, no. 5. – Pp. 491–506. DOI: 10.1007/s00401-008-0417-8
728. Norton, N. Assessment of LMNA copy number variation in 58 probands with dilated cardiomyopathy / N. Norton, J.D. Siegfried, D. Li [et al.] // *Clin. Transl. Sci.* – 2011. – Vol. 4, no. 5. – Pp. 351–352. DOI: 10.1111/j.1752-8062.2011.00305.x
729. Norton, N. Genome-wide studies of copy number variation and exome sequencing identify rare variants in BAG3 as a cause of dilated cardiomyopathy / N. Norton, D. Li, M.J. Rieder [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2011. – Vol. 88, no. 3. – Pp. 273–282. DOI: 10.1016/j.ajhg.2011.01.016
730. Nourbakhsh, N. Steroid-resistant nephrotic syndrome: past and current perspectives / N. Nourbakhsh, R.H. Mak // *Pediatric Health Med. Ther.* – 2017. – Vol. 8. – Pp. 29–37. DOI: 10.2147/PHMT.S100803
731. Nso Roca, A.P. Evolutionary study of children with diffuse mesangial sclerosis / A.P. Nso Roca, A. Peña Carrión, M. Benito Gutierrez [et al.] // *Pediatr. Nephrol.* – 2009. – Vol. 24, no. 5. – Pp. 1013–1019. DOI: 10.1007/s00467-008-1063-z
732. Nugent, A.W. The epidemiology of childhood cardiomyopathy in Australia / A.W. Nugent, P.E. Daubeney, P. Chondros [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2003. – Vol. 348, no. 17. – Pp. 1639–1646. DOI: 10.1056/NEJMoa021737
733. Oba-Shinjo, S.M. Pompe disease in a Brazilian series: clinical and molecular analyses with identification of nine new mutations / S.M. Oba-Shinjo, R. da Silva, F.G. Andrade [et al.] // *J. Neurol.* – 2009. – Vol. 256, no. 11. – Pp. 1881–1890. DOI: 10.1007/s00415-009-5219-y
734. Ochiai, T. Significance of extensive Mongolian spots in Hunter's syndrome / T. Ochiai, K. Ito, T. Okada [et al.] // *Br. J. Dermatol.* – 2003. – Vol. 148, no. 6. – Pp. 1173–1178. DOI: 10.1046/j.1365-2133.2003.05317.x
735. Oechslin, E. Left ventricular non-compaction revisited: a distinct phenotype with genetic heterogeneity? / E. Oechslin, R. Jenni // *Eur. Heart. J.* – 2011. – Vol. 32, no. 12. – Pp. 1446–1456. DOI: 10.1093/eurheartj/ehq508
736. Olivotto, I. Myofilament protein gene mutation screening and outcome of patients with hypertrophic cardiomyopathy / I. Olivotto, F. Girolami, M.J. Ackerman [et al.] // *Mayo Clin. Proc.* – 2008. – Vol. 83, no. 6. – Pp. 630–638. DOI: 10.4065/83.6.630
737. OMIM Gene Map Statistics (Updated Jan 14, 2020). – Available at: <https://www.omim.org/statistics/geneMap>.
738. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM): An Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorders. – Available at: <https://www.omim.org>.
739. Orngreen, M.C. Is muscle glycogenolysis impaired in X-linked phosphorylase b kinase deficiency? / M.C. Orngreen, H.J. Schelhaas, T.D. Jeppesen [et al.] // *Neurology.* – 2008. – Vol. 70, no. 20. – Pp. 1876–1882. DOI: 10.1212/01.wnl.0000289190.66955.67
740. Orvisky, E. Glucosylsphingosine accumulation in tissues from patients with Gaucher disease: correlation with phenotype and genotype / E. Orvisky, J.K. Park,

- M.E. Lamarca [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* – 2002. – Vol. 76, no. 4. – Pp.262–270. DOI: 10.1016/s1096-7192(02)00117-8
741. Osio, A. Myozenin 2 is a novel gene for human hypertrophic cardiomyopathy / A. Osio, L. Tan, S.N. Chen [et al.] // *Circ. Res.* – 2007. – Vol. 100, no. 6. – Pp. 766–768. DOI: 10.1161/01.RES.0000263008.66799.aa
742. Ou, L. Phenotype prediction for mucopolysaccharidosis type I by in silico analysis / L. Ou, M.J. Przybilla, C.B. Whitley // *Orphanet J. Rare Dis.* – 2017. – No. 12, art. num.125. – 14 p. DOI: 10.1186/s13023-017-0678-1
743. Ozen, H. Glycogen storage diseases: New perspectives / H. Ozen // *World J. Gastroenterol.* – 2007. – Vol. 13, no. 18. – Pp. 2541–2553. DOI: 10.3748/wjg.v13.i18.2541
744. Pace, J.M. Defective C-propeptides of the proalpha2(I) chain of type I procollagen impede molecular assembly and result in osteogenesis imperfecta / J.M. Pace, M. Wiese, A.S. Drenguis [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 283, no. 23. – Pp. 16061–16067. DOI: 10.1074/jbc.M801982200
745. Paik, K. Primary focal glomerular sclerosis in children: clinical course and prognosis / K. Paik, B. Lee, H. Cho [et al.] // *Pediatr. Nephrol.* – 2007. – Vol. 22, no. 7. – Pp. 389–395. DOI: 10.1007/s00467-006-0301-5
746. Parini, R. Open issues in Mucopolysaccharidosis type I-Hurler / R. Parini, F. Deodato, M. Di Rocco [et al.] // *Orphanet J. Rare Dis.* – 2017. – No. 12, art. num. 112. – 9 p. DOI: 10.1186/s13023-017-0662-9
747. Park, H.D. Clinical, biochemical, and genetic analysis of a Korean neonate with hereditary tyrosinemia type I / H.D. Park, D.H. Lee, T.Y. Choi [et al.] // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2009. – Vol.47, no. 8. – Pp. 930–933. DOI: 10.1515/CCLM.2009.223
748. Park, J.K. Myoclonic epilepsy in Gaucher disease: genotype-phenotype insights from a rare patient subgroup / J.K. Park, E. Orvisky, N. Tayebi [et al.] // *Pediatr. Res.* – 2003. – Vol. 53, no. 3. – Pp. 387–395. DOI: 10.1203/01.PDR.0000049515.79882.94
749. Park, M.A. Increased apoptosis in cystinotic fibroblasts and renal proximal tubule epithelial cells results from cysteinylolation of protein kinase Cdelta / M.A. Park, V. Pejovic, K.G. Kerisit [et al.] // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2006. – Vol. 17, no. 11. – Pp. 3167–3175. DOI: 10.1681/ASN.2006050474
750. Parker, M.J. Type 1 collagenopathy presenting with a Russell-Silver phenotype / M.J. Parker, C. Deshpande, J. Rankin [et al.] // *Am. J. Med. Genet. A.* – 2011. – Vol. 155A, no. 6. – Pp. 1414–1418. DOI: 10.1002/ajmg.a.33998
751. Pasotti, M. Long-term outcome and risk stratification in dilated cardiomyopathies / M. Pasotti, C. Klersy, A. Pilotto [et al.] // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2008. – Vol. 52, no.15. – Pp. 1250–1260. DOI: 10.1016/j.jacc.2008.06.044
752. Pastores, G.M. Musculoskeletal complications encountered in the lysosomal storage disorders / G.M. Pastores // *Best. Pract. Res. Clin. Rheumatol.* – 2008. – Vol. 22, no 5. – Pp. 937–947. DOI: 10.1016/j.berh.2008.09.005
753. Patrakka, J. Molecular make-up of the glomerular filtration barrier / J. Patrakka, K. Tryggvason // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2010. – Vol. 396, no. 1. – Pp. 164–169. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.04.069

754. Peddy, S.B. Infantile restrictive cardiomyopathy resulting from a mutation in the cardiac troponin T gene / S.B. Peddy, L.A. Vricella, J.E. Crosson [et al.] // *Pediatrics*. – 2006. – Vol. 117, no. 5. – Pp. 1830–1833. DOI: 10.1542/peds.2005.2301.
755. Peeks, F. Clinical and biochemical heterogeneity between patients with glycogen storage disease type IA: the added value of CUSUM for metabolic control / F. Peeks, T.A. H. Steunenbergh, F. de Boer [et al.] // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2017. – Vol. 40, no. 5. – Pp. 695–702. DOI: 10.1007/s10545-017-0039-1
756. Peters, C. Outcome of unrelated donor bone marrow transplantation in 40 children with Hurler syndrome / C. Peters, M. Balthazor, E.G. Shapiro [et al.] // *Blood*. – 1996. – Vol. 87, no. 11. – Pp. 4894–4902.
757. Peters, F. Left ventricular twist in left ventricular noncompaction / F. Peters, B. Khandheria, E. Libhaber [et al.] // *Eur. Heart. J. Cardiovasc. Imaging*. – 2014. – Vol. 15, no. 1. – Pp. 48–55. DOI: 10.1093/ehjci/jet076
758. Philippe, A. Nephtrin mutations can cause childhood-onset steroid-resistant nephrotic syndrome / A. Philippe, F. Nevo, E.L. Esquivel [et al.] // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2008. – Vol. 19, no. 10. – Pp. 1871–1878. DOI: 10.1681/ASN.2008010059
759. Pineda, T. Genotypic and bioinformatic evaluation of the alpha-l-iduronidase gene and protein in patients with mucopolysaccharidosis type I from Colombia, Ecuador and Peru / T. Pineda, S. Marie, J. Gonzalez [et al.] // *Mol. Genet. Metab. Rep.* – 2014. – Vol. 1, no. 1. – Pp. 468–473. DOI: 10.1016/j.ymgmr.2014.10.001
760. Pinto, R. Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal / R. Pinto, C. Caseiro, M. Lemos, [et al.] // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2004. – Vol. 12, no. 2. – Pp. 87–92. DOI: 10.1038/sj.ejhg.5201044
761. Pisoni, R. Important differences in cationic amino acid transport by lysosomal system c and system y+ of the human fibroblast / R. Pisoni, J. Thoene, R. Lemons [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1987. – Vol. 262, no. 31. – Pp. 15011–15018.
762. Pittis, M.G. Molecular and functional characterization of eight novel GAA mutations in Italian infants with Pompe disease / M.G. Pittis, M. Donnarumma, A.L. Montalvo [et al.] // *Hum. Mutat.* – 2008. – Vol. 29, no. 6. – Pp. E27–E36. DOI: 10.1002/humu.20753
763. Pittis, M.G. Molecular genetics of late onset glycogen storage disease II in Italy / M.G. Pittis, M. Filocamo // *Acta Myol.* – 2007. – Vol. 26, no.1. – Pp. 67–71. – Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2949324/pdf/1128-2460.26.067.pdf>.
764. Poe, M.D. Early treatment is associated with improved cognition in Hurler syndrome / M.D. Poe, S.L. Chagnon, M.L. Escolar // *Ann. Neurol.* – 2014. – Vol. 76, no. 5. – Pp. 747–753. DOI: 10.1002/ana.24246
765. Pollard, L.M. Molecular characterization of 355 mucopolysaccharidosis patients reveals 104 novel mutations / L.M. Pollard, J.R. Jones, T.C. Wood // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2013. – Vol. 36, no. 2. – Pp. 179–187. DOI: 10.1007/s10545-012-9533-7
766. Pollitt, R. Mutation analysis of COL1A1 and COL1A2 in patients diagnosed with osteogenesis imperfect type I–IV / R. Pollitt, R. McMahon, J. Nunn [et al.] // *Hum. Mutat.* – 2006. Vol. 27, no. 7. – Pp. 716. DOI: 10.1002/humu.9430
767. Pompe disease GAA variant database (ErasmusMC Rotterdam). – Available at: http://www.pompevariantdatabase.nl/pompe_mutations_list.php?qs= c.307T%3EG&criteria=or&orderby=aMut_ID1.

768. Pompe disease GAA variant database (ErasmusMC Rotterdam). – Available at: <http://www.pompevariantdatabase.nl>.
769. Pompe disease GAA variant database (ErasmusMC Rotterdam). – Available at: http://www.pompevariantdatabase.nl/pompe_mutations_list.php?qs=c.1856G%3EA&criteria=or&orderby=aMut_ID1.
770. Pompe, J.C. Over idiopathische hypertrophie van het hart / J.C. Pompe // *Ned. Tijdschr. Geneeskd.* – 1932. – No. 76. – Pp. 304–312.
771. Poorthuis, B.J. The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands / B.J. Poorthuis, R.A. Wevers, W.J. Kleijer [et al.] // *Hum. Genet.* – 1999. – Vol. 105, no. 1–2. – Pp. 151–156. DOI: 10.1007/s004399900075
772. Posafalvi, A. Clinical utility gene card for: dilated cardiomyopathy (CMD) / A. Posafalvi, J.C. Herkert, R.J. Sinke [et al.] // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2013. – Vol. 21, no. 10. – P. 1185. DOI: 10.1038/ejhg.2012.276
773. Poudrier, J. Frequency of the IVS12 + 5G-->A splice mutation of the fumarylacetoacetate hydrolase gene in carriers of hereditary tyrosinaemia in the French Canadian population of Saguenay-Lac-St-Jean / J. Poudrier, M. St-Louis, F. Lettre [et al.] // *Prenat. Diagn.* – 1996. – Vol. 16, no. 1. – Pp. 59–64. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0223(199601)16:1<59::AID-PD810>3.0.CO;2-D
774. Preisler, N. Late-onset Pompe disease is prevalent in unclassified limb-girdle muscular dystrophies / N. Preisler, Z. Lukacs, L. Vinge [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* – 2013. – Vol. 110, no. 3. – Pp. 287–289. DOI: 10.1016/j.ymgme.2013.08.005
775. Preisler, N. Muscle phosphorylase kinase deficiency: a neutral metabolic variant or a disease? / N. Preisler, M.C. Orngreen, A. Echaniz-Laguna [et al.] // *Neurology* – 2012. – Vol. 78, no. 4. – Pp. 265–268. DOI: 10.1212/WNL.0b013e31824365f9
776. Prencipe, G. Inflammasome activation by cystine crystals: implications for the pathogenesis of cystinosis / G. Prencipe, I. Caiello, S. Cherqui [et al.] // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2014. – Vol. 25, no. 6. – Pp. 1163–1169. DOI: 10.1681/ASN.2013060653
777. Primer-BLAST : A tool for finding specific primers. – Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>.
778. Pushkov, A. Next generation sequencing is the suitable method for identification of hereditary dermatosis with EB symptom complex in Russian patients / A. Pushkov, N. Murashkin, A.P. Fisenko [et al.] // *J. Invest. Dermatol.* – 2019. – Vol. 139, no. S9. – P. 233. – DOI: 10.1016/j.jid.2019.07.115
779. Putschar, M. Uber angeborene Glykogenspeicher-Krankheit des herzens / M. Putschar // *Beitr. Pathol. Anat. Allg. Pathol.* – 1932. – No. 90. – Pp. 222.
780. Pyott, S.M. WNT1 Mutations in families affected by moderately severe and progressive recessive Osteogenesis Imperfecta / S.M. Pyott, T.T. Tran, D.F. Leistriz [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2013. – Vol. 92, no. 4. – Pp. 590–597. DOI: 10.1016/j.ajhg.2013.02.009
781. QIAGEN.QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook. – 5th ed. – 2016. – Available at: <https://www.qiagen.com/ch/resources/download.aspx?id=62a200d6-faf4-469b-b50f-2b59cf738962&lang=en>.
782. Qian, J. Applying targeted next generation sequencing to dried blood spot specimens from suspicious cases identified by tandem mass spectrometry-based newborn screening /

- J. Qian, X. Wang, J. Liu [et al.] // *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* – 2017. – Vol. 30, no. 9. – Pp. 979–988. DOI: 10.1515/jpem-2017-0003
783. Quarta, G. Familial evaluation in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: impact of genetics and revised task force criteria / G. Quarta, A. Muir, A. Pantazis [et al.] // *Circulation* – 2011. – Vol. 123, no. 23. – Pp. 2701–2709. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.976936
784. R : The R Project for Statistical Computing. – Available at: <https://www.r-project.org/>.
785. Raben, N. Monitoring autophagy in lysosomal storage disorders / N. Raben, L. Shea, V. Hill [et al.] // *Methods. Enzymol.* – 2009. – Vol. 453. – Pp. 417–449. DOI: 10.1016/S0076-6879(08)04021-4
786. Raja, M. Movement and mood disorder in two brothers with Gaucher disease / M. Raja, A. Azzoni, F. Giona [et al.] // *Clin. Genet.* – 2007. – Vol. 72, no. 4. – Pp. 357–361. DOI: 10.1111/j.1399-0004.2007.00863.x
787. Rake, J.P. Glycogen storage disease type I: diagnosis, management, clinical course and outcome. Results of the European Study on Glycogen Storage Disease Type I / J.P. Rake, G. Visser, P. Labrune [et al.] // *Eur. J. Pediatr.* – 2002. – Vol. 161 (Suppl 1). – Pp. S20–S34. DOI: 10.1007/s00431-002-0999-4
788. Raluy-Callado, M. The impact of Hunter syndrome (mucopolysaccharidosis type II) on health-related quality of life / M. Raluy-Callado, W.H. Chen, D.A. Whiteman [et al.] // *Orphanet J. Rare Dis.* – 2013. – No. 8, art. num. 101. – 10 p. DOI: 10.1186/1750-1172-8-101
789. Ramaswami, U. And on behalf of the FOS European investigators. Clinical manifestations of Fabry disease in children: Data from the Fabry Outcome Survey / U. Ramaswami, C. Whybra, R. Parini, [et al.] // *Acta Paediatrica.* – 2006. – Vol. 95, no. 1. – Pp. 86–92.
790. Rashed, M.S. Clinical application of tandem mass spectrometry: ten years of diagnosis and screening for inherited metabolic diseases / M.S. Rashed // *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* – 2001. – No 758. – Pp. 27–48. DOI: 10.1016/S0378-4347(01)00100-1
791. Rashed, M.S. Tandem mass spectrometric assay of succinylacetone in urine for the diagnosis of hepatorenal tyrosinemia / M.S. Rashed, L.Y. Al-Ahaidib, O.Y. Al-Dirbashi [et al.] // *Anal. Biochem.* – 2005. – Vol. 339, no. 2. – Pp. 310–317. DOI: 10.1016/j.ab.2005.01.014
792. Rauch, F. Relationship between genotype and skeletal phenotype in children and adolescents with osteogenesis imperfecta / F. Rauch, L. Lalic, P. Roughley [et al.] // *J. Bone Miner. Res.* – 2010. – Vol. 25, no. 6. – Pp. 1367–1374. DOI: 10.1359/jbmr.091109
793. Rauch, F. Static and dynamic bone histomorphometry in children with osteogenesis imperfecta / F. Rauch, R. Travers, A.M. Parfitt [et al.] // *Bone.* – 2000. Vol. 26, no. 6. – Pp. 581–589. DOI: 10.1016/S8756-3282(00)00269-6
794. Ravenscroft, G. Whole exome sequencing in foetal akinesia expands the genotype-phenotype spectrum of GBE1 glycogen storage disease mutations / G. Ravenscroft, E.M. Thompson, E.J. Todd [et al.] // *Neuromuscul. Disord.* – 2013. – Vol. 23, no. 2. – Pp. 165–169. DOI: 10.1016/j.nmd.2012.11.005
795. Refaat, M.M. Genetic variation in the alternative splicing regulator RBM20 is associated with dilated cardiomyopathy / M.M. Refaat, S.A. Lubitz, S. Makino [et al.] // *Heart. Rhythm.* – 2012. – Vol. 9, no. 3. – Pp. 390–396. DOI: 10.1016/j.hrthm.2011.10.016

796. Remiche, G. Extended phenotype description and new molecular findings in late onset glycogen storage disease type II: a northern Italy population study and review of the literature / G. Remiche, D. Ronchi, F. Magri [et al.] // *J. Neurol.* – 2014. – Vol. 261, no. 1. – Pp. 83–97. DOI: 10.1007/s00415-013-7137-2
797. Reusche, E. A mild juvenile variant of type IV glycogenosis / E. Reusche, F. Aksu, H.H. Goebel [et al.] // *Brain. Dev.* – 1992. – Vol. 14, no. 1. – Pp. 36–43. DOI: 10.1016/s0387-7604(12)80277-4
798. Rheault, M.N. The Genetics of Nephrotic Syndrome / M.N. Rheault, R.A. Gbadegesin // *J. Pediatr. Genet.* – 2016. – Vol. 5, no. 1. – Pp. 15–24. DOI: 10.1055/s-0035-1557109
799. Richard, E. New Insights into Therapeutic Options for Pompe Disease / E. Richard, G. Douillard-Guilloux, C. Caillaud [et al.] // *Life.* – 2011. – Vol. 63, no. 11. – Pp. 979–986. DOI: 10.1002/iub.529
800. Richard, P. Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy / P. Richard, P. Charron, L. Carrier [et al.] // *Circulation.* – 2003. – Vol. 107, no. 17. – Pp. 2227–2232. DOI: 10.1161/01.CIR.0000066323.15244.54
801. Richards, S. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology / S. Richards, N. Aziz, S. Bale [et al.] // *Genet. Med.* – 2015. – Vol. 17, no 5. – Pp. 405–424. DOI: 10.1038/gim.2015.30
802. Richardson, P. Report of the 1995 World Health Organization/ International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies / P. Richardson, W. McKenna, M. Bristow [et al.] // *Circulation.* – 1996. – Vol. 93, no. 5. – Pp. 841–842. DOI: 10.1161/01.cir.93.5.841
803. Rinaldo, P. Inborn errors of amino acid, organic acid, and fatty acid metabolism / P. Rinaldo, S.H. Hahn, D. Matern // *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics* / C.A. Burtis, E.R. Ashwood, D.E. Bruns (Eds.). – St. Louis, Missouri: Elsevier, 2006. – Pp. 2218–2219.
804. Roberts, W.C. Examination of Isolated Ventricular Noncompaction (Hypertrabeculation) as a Distinct Entity in Adults / W.C. Roberts, S.J. Karia, J.M. Ko [et al.] // *Am. J. Cardiol.* – 2011. – Vol. 108, no. 5. – Pp. 747–752. DOI: 10.1016/j.amjcard.2011.04.027
805. Roche. SeqCap EZ Library SR. User's Guide. Available at: http://technical-support.roche.com/_layouts/net.pid/Download.aspx?documentID=ee33953e-0bf0-e711-4ebf-00215a9b3428&fileName=RSS_SeqCap_EZ_UGuide_v5.4&extension=pdf&mimeType=application%2Fpdf&inline=False.
806. Rolfs, A. Glucosylsphingosine is a Highly Sensitive and Specific Biomarker for Primary Diagnostic and Follow-Up Monitoring in Gaucher Disease in a Non-Jewish, Caucasian Cohort of Gaucher Disease Patients / A. Rolfs, A. Giese, U. Grittner [et al.] // *PLoS. One.* – 2013. – Vol. 8, no. 11, e79732. – 9 p. DOI: 10.1371/journal.pone.0079732
807. Rolfs, A. Prevalence of Fabry disease in patients with cryptogenic stroke: a prospective study / A. Rolfs, T. Böttcher, M. Zschiesche [et al.] // *Lancet.* – 2005. – Vol. 366, no. 9499. – Pp. 1794–1796. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)67635-0

808. Rombach, S.M. Long term enzyme replacement therapy for Fabry disease: effectiveness on kidney, heart and brain / S.M. Rombach, B.E. Smid, M.G. Bouwman [et al.] // *Orphanet J. Rare Dis.* – 2013. – No. 8, art. num. 47. – 8 p. DOI: 10.1186/1750-1172-8-47
809. Rood, I.M. Genetic causes of focal segmental glomerulosclerosis: implications for clinical practice / M. Rood, J.K. Deegens, J.F. Wetzels // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2012. – Vol.27, no. 3. – Pp. 882–890. DOI: 10.1093/ndt/gfr771
810. Rootwelt, H. Fumarylacetoacetase mutations in tyrosinaemia type I / H. Rootwelt, K. Hoie, R. Berger [et al.] // *Hum. Mutat.* – 1996. – Vol. 7, no. 3. – Pp. 239–243. DOI: 10.1002/(SICI)1098-1004(1996)7:3<239::AID-HUMU8>3.0.CO;2-5
811. Rosa, L.V. Noncompaction cardiomyopathy: a current view / L.V. Rosa, V.M. Salemi, L.M. Alexandre [et al.] // *Arq. Bras. Cardiol.* – 2011. – Vol. 97, no. 1. – Pp. 13–19. DOI: 10.1590/s0066-782x2011000900021
812. Roscher, A. The natural history of glycogen storage disease types VI and IX: Long-term outcome from the largest metabolic center in Canada / A. Roscher, J. Patel, S. Hewson [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* – 2014. – Vol. 113, no. 3. – Pp. 171–176. DOI: 10.1016/j.ymgme.2014.09.005
813. Ross, N. Newborn screening for lysosomal storage diseases: an ethical and policy analysis / N. Ross // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2012. – Vol. 35, no. 4. – Pp. 627–634. DOI: 10.1007/s10545-011-9435-0
814. Rossanti, R. Molecular assay for an intronic variant in NUP93 that causes steroid resistant nephrotic syndrome / R. Rossanti, A. Shono, K. Miura [et al.] // *J. Hum. Genet.* – 2019. – Vol. 64, no. 7. – Pp. 673–679. DOI: 10.1038/s10038-019-0606-4
815. Roth, K. Genetics of von Gierke Disease (Glycogen-Storage Disease Type 1) : Treatment & Management / K. Roth; M. Descartes (Ed.) // *Genet. Metab. Dis.* – 2009 [updated Aug 10, 2017]. – Available at: <http://emedicine.medscape.com/article/949937-treatment>.
816. Roux-Buisson, N. Prevalence and significance of rare RYR2 variants in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: Results of a systematic screening / N. Roux-Buisson, E. Gandjbakhch, E. Donal [et al.] // *Heart Rhythm.* – 2014. – Vol. 17, no. 11. – Pp. 1547–1571. DOI: 10.1016/j.hrthm.2014.07.020
817. Ruck, J. Fassier-Duval femoral rodding in children with osteogenesis imperfecta receiving bisphosphonates: functional outcomes at one year / J. Ruck, N. Dahan-Oliel, K. Montpetit [et al.] // *J. Child. Orthop.* – 2011. – Vol. 5, no. 3. – Pp. 217–224. DOI: 10.1007/s11832-011-0341-7
818. Ruivo, R. Mechanism of proton/substrate coupling in the heptahelical lysosomal transporter cystinosin / R. Ruivo, G.C. Bellenchi, X. Chen [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2012. – Vol. 109, no. 5. – Pp. E210–E217. DOI: 10.1073/pnas.1115581109
819. Rush, E.T. Genetics of Osteogenesis Imperfecta / E.T. Rush, H.B. Plotkin; L.O. Rohena (Ed.) // *Medscape.* – 2019. – Available at: <https://emedicine.medscape.com/article/947588-overview>.
820. Sachdev, B. Prevalence of Anderson-Fabry disease in male patients with late onset hypertrophic cardiomyopathy / B. Sachdev, T. Takenaka, H. Teraguchi [et al.] // *Circulation.* – 2002. – Vol. 105, no. 12. – Pp. 1407–1411. DOI: 10.1161/01.cir.0000012626.81324.38
821. Sachs, B. On arrested cerebral development with special reference to cortical pathology / B. Sachs // *J. Nerv. Ment. Dis.* – 1887. – No. 14. – Pp. 541–554.

822. Sadowski, C.E. A single-gene cause in 29.5% of cases of steroid-resistant nephrotic syndrome / C.E. Sadowski, S. Lovric, S. Ashraf [et al.] // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2015. – Vol. 26, no. 6. – Pp. 1279–1289. DOI: 10.1681/ASN.2014050489
823. Saito, S. Structural and clinical implications of amino acid substitutions in α -L-iduronidase: Insight into the basis of mucopolysaccharidosis type I / S. Saito, K. Ohno, N. Maita [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* – 2014. – Vol. 111, no. 2. – Pp. 107–112. DOI: 10.1016/j.ymgme.2013.10.005
824. Sakuraba, H. Plasma lyso-Gb3: a biomarker for monitoring Fabry patients during enzyme replacement therapy / H. Sakuraba, T. Togawa, T. Tsukimura, H. Kato // *Clin. Exp. Nephrol.* – 2018. – Vol. 22, no. 4. – Pp. 843–849. DOI: 10.1007/s10157-017-1525-3
825. Sanderson, S. The incidence of inherited metabolic disorders in the West Midland, UK / S. Sanderson, A. Green, M.A. Preece [et al.] // *Arch. Dis. Child.* – 2006. – Vol. 91, no. 11. – Pp. 896–899. DOI: 10.1136/adc.2005.091637
826. Santer, R. Molecular genetic basis and prevalence of glycogen storage disease type IIIA in the Faroe Islands / R. Santer, M. Kinner, U. Steuerwald [et al.] // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2001. – Vol. 9, no. 5. – Pp. 388–391. DOI: 10.1038/sj.ejhg.5200632
827. Santin, S. Nephrit mutations cause childhood- and adult-onset focal segmental glomerulosclerosis / S. Santin, R. Garcia-Maset, P. Ruiz [et al.] // *Kidney. Int.* – 2009. – Vol. 76, no. 12. – Pp. 1268–1276. DOI: 10.1038/ki.2009.381
828. Sarin, S. Insights into the Renal Pathogenesis in Schimke Immuno-Osseous Dysplasia: A Renal Histological Characterization and Expression Analysis / S. Sarin, A. Javidan, F. Boivin [et al.] // *J. Histochem. Cytochem.* – 2015. – Vol. 63, no. 1. – Pp. 32–44. DOI: 10.1369/0022155414558335
829. 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 [et al.] // *J. IEMS.* – 2017. – Vol. 5. – P. 326. DOI: 10.1177/2326409817722292
830. Savostyanov, K.V. 90 Russian patients with Hunter syndrome: A five-year experience / K.V. Savostyanov, A.A. Pushkov, N.V. Zhurkova [et al.] // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2018. – Vol. 41 (Suppl 1). – P. 174.
831. Savostyanov, K. Alterations of the GBA gene in 120 Russian patients with Gaucher disease / K. Savostyanov, A. Pushkov, A. Gevorkyan [et al.] // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2015. – Vol. 38(Suppl 1). – P. 272.
832. Savostyanov, K. Glucosylfingosine (Lyso-GL1) may be the primary biomarker for screening Gaucher Disease in Russian patients / K. Savostyanov, A. Pushkov, L. Murav'ova [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* – 2019. – Vol. 126, no. S2. – P. S130. DOI: 10.1016/j.ymgme.2018.12.333
833. Savostyanov, K. Lyso-GB3 is as a primary biomarker for Fabry disease screening among high-risk contingents / K. Savostyanov, A. Pushkov, N. Mazanova [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* – 2019. – Vol. 126, no. S2. – P. S130. DOI: 10.1016/j.ymgme.2018.12.333
834. Savostyanov, K. Novel mutations in children with steroid-resistant nephrotic syndrome in Russian population / K. Savostyanov, D. Sladkov, A. Tsygin [et al.] // *Arch. Dis. Child.* – 2017. – Vol. 102 (Suppl 2). – Pp. A24–A25. DOI: 10.1136/archdischild-2017-313273.63
835. Savostyanov, K. Selective screening for nephropathic cystinosis among high-risk contingents of the children population in Russia / K. Savostyanov, A. Pushkov,

- N. Zhurkova[et al] // *Mol. Gen. Metab.* – 2020. – Vol. 129, no. 2. – P. S144. DOI: 10.1016/j.ymgme.2019.11.380
836. Scarpa, M. Mucopolysaccharidosis type II: European recommendations for the diagnosis and multidisciplinary management of a rare disease / M. Scarpa, Z. Almasy, M. Beck [et al] // *Orphanet J. Rare Dis.* – 2011. – No. 6, art. num. 72. – 18 p. DOI: 10.1186/1750-1172-6-72
837. Schaap, T. Incidence of mucopolysaccharidoses in Israel: is Hunter disease a “Jewish disease”? / T. Schaap, G. Bach // *Hum. Genet.* – 1980. – Vol. 56, no. 2. – Pp. 221–223. DOI: 10.1007/bf00295699
838. Schaefer, E. Genotype and phenotype in Fabry disease: analysis of the Fabry Outcome Survey / E. Schaefer, A. Mehta, A. Gal // *Acta. Paediatr. Suppl.* – 2005. – Vol. 94, no. 447. – Pp. 87–92. DOI: 10.1111/j.1651-2227.2005.tb02119.x
839. Schiffmann R. Fabry disease / R. Schiffmann // *Pharmacol. Ther.* – 2009. – Vol. 122, no. 1. – Pp. 65–77. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2009.01.003
840. Schleit, J. Molecular Outcome, Prediction, and Clinical Consequences of Splice Variants in COL1A1, Which Encodes the pro α 1(I) Chains of Type I Procollagen / J. Schleit, S.S. Bailey, T. Tran [et al.] // *Hum. Mutat.* – 2015. – Vol. 36, no. 7. – Pp. 728–739. DOI: 10.1002/humu.22812
841. Schlondorff, J. TRPC6 mutations associated with focal segmental glomerulosclerosis cause constitutive activation of NFAT-dependent transcription / J. Schlondorff, D. Del Camino, R. Carrasquillo [et al.] // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 2009. – Vol. 296, no. 3. – Pp. 558–569. DOI: 10.1152/ajpcell.00077.2008
842. Schlune, A. Single dose NTBC-treatment of hereditary tyrosinemia type I / A. Schlune, E. Thimm, D. Herebian [et al.] // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2012. – Vol. 35, no. 5. – Pp. 831–836. DOI: 10.1007/s10545-012-9450-9
843. Schoser, B. Clinicopathological analysis of the homozygous p.W1327X AGL mutation in glycogen storage disease type 3 / B. Schoser, D. Gläser, J. Müller-Höcker // *Am. J. Med. Genet. A.* – 2008. – Vol. 146A, no. 22. – Pp. 2911–2915. DOI: 10.1002/ajmg.a.32529
844. Schouten, J.P. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification / J.P. Schouten, C.J. McElgunn, R. Waaijer [et al.] // *Nucleic. Acids. Res.* – 2002. – Vol. 30, no. 12, e57. – 13 p. DOI: 10.1093/nar/gnf056
845. Schuchman, E.H. Niemann-Pick Disease: Mutation Update, Genotype/Phenotype Correlations, and Prospects for Genetic Testing / E.H. Schuchman, S.R. Miranda // *Genet. Test.* – 1997. – Vol. 1, no. 1. – Pp. 13–19. DOI: 10.1089/gte.1997.1.13
846. Schüller, A. Toward deconstructing the phenotype of late-onset Pompe disease / A. Schüller, S. Wenninger, N. Strigl-Pill [et al.] // *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* – 2012. – Vol. 160, no. 1. – Pp. 80–88. DOI: 10.1002/ajmg.c.31322
847. Schulman, J.D. Cystine: Compartmentalization within Lysosomes in Cystinotic Leukocytes / J.D. Schulman, K.H. Bradley, J.E. Seegmiller // *Science.* – 1969. – Vol. 166, no. 3909. – Pp. 1152–1154. DOI: 10.1126/science.166.3909.1152
848. Schumacher, V. Spectrum of early onset nephrotic syndrome associated with WT1 missense mutations / V. Schumacher, K. Schärer, E. Wühl [et al.] // *Kidney. Int.* – 1998. – Vol. 53, no. 6. – Pp. 1594–1600. DOI: 10.1046/j.1523-1755.1998.00948.x

849. Schwetz, B.A. From the Food and Drug Administration / B.A. Schwetz // *JAMA*. – 2002. – Vol. 287, no. 9. – Pp. 1103. DOI:10.1001/jama.285.21.2705
850. Scott, C.R. Identification of Infants at Risk for Developing Fabry, Pompe, or Mucopolysaccharidosis-I from Newborn Blood Spots by Tandem Mass Spectrometry / C.R. Scott, S. Elliott, N. Buroker [et al.] // *J. Pediatr.* – 2013. – Vol. 163, no. 2. – Pp. 498–503. DOI: 10.1016/j.jpeds.2013.01.031
851. Scott, H.S. An 86-bp VNTR within IDUA is the basis of the D4S111 polymorphic locus / H.S. Scott, P.V. Nelson, M.E. MacDonald [et al.] // *Genomics*. – 1992. – Vol. 14, no. 4. – Pp. 1118–1120. DOI: 10.1016/s0888-7543(05)80145-4
852. Scott, H.S. Molecular genetics of mucopolysaccharidosis type I: diagnostic, clinical, and biological implications / H.S. Scott, S. Bunge, A. Gal [et al.] // *Hum Mutat.* – 1995. – Vol. 6, no. 4. – Pp. 288–302. DOI: 10.1002/humu.1380060403
853. Scott, H.S. Multiple polymorphisms within the alpha-L-iduronidase gene (IDUA): implications for a role in modification of MPS-I disease phenotype / H.S. Scott, P.V. Nelson, T. Litjens [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* – 1993. – Vol. 2, no. 9. – Pp. 1471–1473. DOI: 10.1093/hmg/2.9.1471
854. Scriver, C.R. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease / C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly [et al.] (Eds.). – 4 vol. set. – 8th ed. – New York: McGraw Hill, 2001. – 7012 p.
855. Seidman, C.J. Identifying Sarcomere Gene Mutations in HCM: A Personal History / C. Seidman, J. Seidman // *Circ. Res.* – 2011. – Vol. 108, no. 6. – Pp. 743–750. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.223834
856. Semler, O. A mutation in the 5-UTR of IFITM5 creates an inframe start codon and causes autosomal-dominant osteogenesis imperfecta type V with hyperplastic callus / O. Semler, L. Garbes, K. Keupp [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2012. – Vol. 91, no. 2. – Pp. 349–357. DOI: 10.1016/j.ajhg.2012.06.011
857. Sen, E.S. Clinical genetic testing using a custom-designed steroid-resistant nephrotic syndrome gene panel: analysis and recommendations / E.S. Sen, P. Dean, L. Yarram-Smith [et al.] // *J. Med. Genet.* – 2017. – Vol. 54, no. 12. – Pp. 795–804. DOI: 10.1136/jmedgenet-2017-104811
858. Sen-Chowdhry, S. Genetics of Restrictive Cardiomyopathy / S. Sen-Chowdhry, P. Syrris, W.J. McKenna // *Heart. Fail. Clin.* – 2010. – Vol. 6, no. 2. – Pp. 179–186. DOI: 10.1016/j.hfc.2009.11.005
859. Sen-Chowdhry, S. Left-dominant Arrhythmogenic Cardiomyopathy: An Under-Recognized Clinical Entity / S. Sen-Chowdhry, P. Syrris, S.K. Prasad [et al.] // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2008. – Vol. 52, no. 25. – Pp. 2175–2187. DOI: 10.1016/j.jacc.2008.09.019
860. Sentner, C.P. Glycogen storage disease type III: diagnosis, genotype, management, clinical course and outcome / C.P. Sentner, I.J. Hoogeveen, D.A. Weinstein [et al.] // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2016. – Vol. 39, no. 5. – Pp. 697–704. DOI:10.1007/s10545-016-9932-2
861. Serrano-Perez, M.C. Endoplasmic reticulum-retained podocin mutants are massively degraded by the proteasome / M.C. Serrano-Perez, F.C. Tilley, F. Nevo [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2018. – Vol. 293, no. 11. – Pp. 4122–4133. DOI: 10.1074/jbc.RA117.001159



862. Servais, A. Late-Onset Nephropathic Cystinosis: Clinical Presentation, Outcome, and Genotyping / A. Servais, V. Morinière, J.P. Grünfeld [et al.] // Clin. J. Am. Soc. Nephrol. – 2008. – Vol. 3, no. 1. – Pp. 27–35. DOI: 10.2215/CJN.01740407
863. Seymour, C.A. Newborn screening for inborn errors of metabolism: a systematic review / C.A. Seymour, S.A. Thomason, R.A. Chalmers // Health. Technol. Assess. – 1997. – Vol. 1, no. 11. – Pp. 87–95.
864. Shah, P.M. Role of Echocardiography in Diagnostic and Hemodynamic Assessment of Hypertrophic Subaortic Stenosis / P.M. Shah, R. Gramiak, A.G. Adelman [et al.] // Circulation. – 1971. – Vol. 44, no. 5. – Pp. 891–898. DOI: 10.1161/01.cir.44.5.891
865. Shah, S. Gaucher's disease type III C: Unusual cause of intracardiac calcification / S. Shah, A. Misri, M. Bhat [et al.] // Ann. Pediatr. Cardiol. – 2008. – Vol. 1, no. 2. – Pp. 144–146. DOI: 10.4103/0974-2069.43883
866. Shaheen, R. Study of autosomal recessive osteogenesis imperfecta in Arabia reveals a novel locus defined by TMEM38B mutation / R. Shaheen, A.M. Alazami, M.J. Alshammari [et al.] // J. Med. Genet. – 2012. – Vol. 49, no.10. – Pp. 630–635. DOI: 10.1136/jmedgenet-2012-101142
867. Shaker, J.L. Recent developments in osteogenesis imperfect / J.L. Shaker, C. Albert, J. Fritz [et al.] // F1000Res. – 2015 – Vol. 4. – Pp. 681. DOI: 10.12688/f1000research.6398.1
868. Shea, L. Autophagy in skeletal muscle: implications for Pompe disease / L. Shea, N. Raben // Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. – 2009. – Vol. 47 (Suppl 1). – Pp. 42–47. DOI: 10.5414/cpp47042
869. Shen, J. Mutations in Exon 3 of the glycogen debranching enzyme gene are associated with glycogen storage disease type III that is differentially expressed in liver and muscle / J. Shen, Y. Bao, H.M. Liu [et al.] // J. Clin. Invest. – 1996. – Vol. 98, no. 2. – Pp. 352–357. DOI: 10.1172/JCI118799
870. Shieh, J.J. Frequent mutation of Chinese patients with infantile type of GSD II in Taiwan: evidence for a founder effect / J.J. Shieh, C.Y. Lin // Hum. Mutat. – 1998. – Vol. 11, no. 4. – Pp. 306–312. DOI: 10.1002/(SICI)1098-1004(1998)11:4<306::AID-HUMU8>3.0.CO;2-S
871. Shoulders, M.D. Collagen structure and stability / M.D. Shoulders, R.T. Raines // Annu. Rev. Biochem. – 2009. – Vol. 78. – Pp. 929–958. DOI: 10.1146/annurev.biochem.77.032207.12083
872. Sibille, A. Phenotype/genotype correlations in Gaucher disease type-I – Clinical and therapeutic implications / A. Sibille, C.M. Eng, S.J. Kim [et al.] // Am. J. Hum. Genet. – 1993. – Vol. 52, no. 6. – Pp. 1094–1101. – Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1682271/>.
873. Sidransky, E. Epidermal abnormalities may distinguish type 2 from type 1 and type 3 of Gaucher disease / E. Sidransky, M. Fartasch, R.E. Lee [et al.] // Pediatr. Res. – 1996. – Vol. 39, no. 1. – Pp. 134–141. DOI: 10.1203/00006450-199601000-00020.
874. Sidransky, E. Gaucher disease: insights from a rare Mendelian disorder / E. Sidransky // Discov. Med. – 2012. – Vol. 14, no. 77. – Pp. 273–281. – Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4141347/pdf/nihms_613030.pdf?tool=EBI.
875. Sifuentes, M. A follow-up study of MPS I patients treated with laronidase enzyme replacement therapy for 6 years / M. Sifuentes, R. Doroshov, R. Hoft [et al.] // Mol. Genet. Metab. – 2007. – Vol. 90, no. 2. – Pp. 171–180. DOI: 10.1016/j.jmgme.2006.08.007

876. Sillence, D.O. Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta / D.O. Sillence, A. Senn, D.M. Danks // *J. Med. Genet.* – 1979. – Vol. 16, no. 2. – Pp. 101–116. DOI:10.1136/jmg.16.2.101
877. Simoens, S. Deficiency for the ER-stress transducer OASIS cause severe recessive osteogenesis imperfect in humans / S. Simoens, F. Malfait, S. d’Hondt [et al.] // *Orphanet J. Rare Dis.* – 2013. – Vol. 8, art. num. 154. – 6 p. DOI: 10.1186/1750-1172-8-154
878. Sinclair, G. Heterologous expression and characterization of a rare Gaucher disease mutation (c.481C>T) from a Canadian aboriginal population using archival tissue samples / G. Sinclair, F.Y. Choy, P. Ferreira // *Mol. Genet. Metab.* – 2001. – Vol. 74, no. 3. – Pp. 345–352. DOI: 10.1006/mgme.2001.3215
879. Singer, R.B. Mortality in various types of osteogenesis imperfect / R.B. Singer, S.A. Ogston, C.R. Paterson // *J. Inher. Metab. Dis.* – 2001. – Vol. 33. – Pp. 216–220. – Available at: <https://www.researchgate.net/publication/11790291>.
880. Sinha, A. Nephrotic syndrome Indian / A. Sinha, A. Bagga // *Indian J. Pediatr.* – 2012. – Vol. 79, no. 8. – Pp. 1045–1055. DOI: 10.1007/s12098-012-0776-y
881. Sirrs, S. The frequencies of different inborn errors of metabolism in adult metabolic centres: Report from the ssiem adult metabolic physicians group / S. Sirrs, C. Hollak, M. Merkel [et al.] // *JIMD Rep.* – 2016. – Vol. 27. – Pp. 85–91. DOI:10.1007/8904_2015_435
882. Sladkov, D. High Prevalence of WT1 Gene Mutations in Patients with Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome // D. Sladkov, K. Savostyanov, A. Nikitin [et al.] // *Arch. Dis. Child.* – 2019. – Vol. 104, no. S3 (A1–A428). – P. A4. DOI: 10.1136/archdischild-2019-epa.8
883. Sleno, L. Ion activation methods for tandem mass spectrometry / L. Sleno, D.A. Volmer // *J. Mass. Spectrom.* – 2004. – Vol. 39, no. 10. – Pp. 1091–1112. DOI: 10.1002/jms.703
884. Slonim, A.E. Identification of two subtypes of infantile acid maltase deficiency / A.E. Slonim, L. Bulone, S. Ritz [et al.] // *J. Pediatr.* – 2000. – Vol. 137, no. 2. – Pp. 283–285. DOI: 10.1067/mpd.2000.107112
885. Smid, B.E. Plasma globotriaosylsphingosine in relation to phenotypes of Fabry disease / B.E. Smid, L. van der Tol, M. Biegstraaten [et al.] // *J. Med. Genet.* – 2015. – Vol. 52, no. 4. – Pp. 262–268. DOI: 10.1136/jmedgenet-2014-102872
886. Smith, W. Sibling phenotype concordance in classical infantile Pompe disease / W. Smith, J. Sullivan-Saarela, J.S. Li [et al.] // *Am. J. Med. Genet.* – 2007. – Vol. 143, no. 21. – Pp. 2493–2501. DOI: 10.1002/ajmg.a.31936
887. Snappes, I. Un cas d’hypoglycémie avec acetonémie chez un enfant / I. Snappes, S. Van Creveld // *Bull. Mem. Soc. Med. Hop.* – 1928. – No.52. – Pp. 1315.
888. Snider A.J. Sphingosine Kinase: Role in Regulation of Bioactive Sphingolipid Mediators in Inflammation / A.J. Snider, K.A. Orr Gandy, L.M. Obeid // *Biochimie.* – 2010. – Vol. 92, no. 6. – Pp. 707–715. DOI: 10.1016/j.biochi.2010.02.008
889. Soden, S.E. Effectiveness of exome and genome sequencing guided by acuity of illness for diagnosis of neurodevelopmental disorders / S.E. Soden, C.J. Saunders, L.K. Willig [et al.] // *Sci. Transl. Med.* – 2014. – Vol. 6, no. 265. – Pp. 265ra168. DOI: 10.1126/scitranslmed.3010076.

890. Soliman, N.A. Nephropathic cystinosis in children: An overlooked disease / N.A. Soliman, R. El-Baroudy, A. Rizk [et al.] // Saudi. J. Kidney. Dis. Transpl. – 2009. – Vol. 20, no. 3. – Pp. 436–442. Available at: <https://www.researchgate.net/publication/24401271>.
891. Sorge, J. High level transcription of the glucocerebrosidase pseudogene in normal subjects and patients with Gaucher disease / J. Sorge, E. Gross, C. West [et al.] // J. Clin. Invest. – 1990. – Vol. 86, no. 4. – Pp. 1137–1141. DOI: 10.1172/JCI114818/
892. Sorge, J. Molecular cloning and nucleotide sequence of human glucocerebrosidase cDNA / J. Sorge, C. West, B. Westwood, E. Beutler // Proc. Nat. Acad. Sci. – 1985. – Vol. 82, no. 21. – Pp. 7289–7293. DOI: 10.1073/pnas.82.21.7289
893. Souillet, G. Outcome of 27 patients with Hurler's syndrome transplanted from either related or unrelated haematopoietic stem cell sources / G. Souillet, N. Guffon, I. Maire [et al.] // Bone Marrow Transplant. – 2003. – Vol. 31, no. 12. – Pp. 1105–1117. DOI: 10.1038/sj.bmt.1704105.
894. Spacil, Z. High throughput assay of nine lysosomal enzymes for newborn screening / Z. Spacil, H.B. Tatipaka, M. Marcenas [et al.] // Clin. Chem. – 2013. – Vol. 59, no. 3. – Pp. 502–511. DOI: 10.1373/clinchem.2012.189936
895. Spada, M. High Incidence of Later-Onset Fabry Disease Revealed by Newborn Screening / M. Spada, S. Pagliardini, M. Yasuda [et al.] // Am. J. Hum. Genet. – 2006. – Vol. 79, no. 1. – Pp. 31–40. DOI: 10.1086/504601
896. Spampanato, C. Transcription factor EB (TFEB) is a new therapeutic target for Pompe disease / C. Spampanato, E. Feeney, L. Li [et al.] // EMBO Mol. Med. – 2013. – Vol. 5, no. 5. – Pp. 691–706. DOI: 10.1002/emmm.201202176
897. Spear, G.S. Renal allografts in cystinosis and mesangial demography / G.S. Spear, M.C. Gubler, R. Habib, M. Broyer // Clin. Nephrol. – 1989. – Vol. 32, no. 6. – Pp. 256–261.
898. Spiegel, S. Sphingosine 1-Phosphate, a Key Cell Signaling Molecule / S. Spiegel, S. Milstien // J. Bio. Chemist. – 2002. – Vol. 277, no. 29. – Pp. 25851–25854. DOI: 10.1074/jbc.R200007200
899. Spirito, P. The management of hypertrophic cardiomyopathy / P. Spirito, C.E. Seidman, W.J. McKenna [et al.] // N. Engl. J. Med. – 1997. – Vol. 336, no. 7552. – Pp. 775–785. DOI: 10.1136/bmj.332.7552.1251
900. Starr, M.C. COQ2 nephropathy: a treatable cause of nephrotic syndrome in children / M.C. Starr, I.J. Chang, L.S. Finn [et al.] // Pediatr. Nephrol. – 2018. – Vol. 33, no. 7. – Pp. 1257–1261. DOI: 10.1007/s00467-018-3937-z
901. Stavropoulos, D.J. Whole genome sequencing expands diagnostic utility and improves clinical management in pediatric medicine / D.J. Stavropoulos, D. Merico, R. Jobling [et al.] // NPJ Genom. Med. – 2016. – No. 1, art. num. 15012. DOI: 10.1038/npjgenmed.2015.12
902. Stenson, P.D. Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update / P.D. Stenson, E.V. Ball, M. Mort [et al.] // Hum. Mutat. – 2003. – Vol. 21, no. 6. – Pp. 577–581. DOI: 10.1002/humu.10212
903. Stephen, J. Mutation spectrum of COL1A1 and COL1A2 genes in Indian patients with osteogenesis imperfecta / J. Stephen, A. Shukla, A. Dalal [et al.] // Am. J. Med. Genet. Part A. – 2014. – Vol. 164A, no. 6. – Pp. 1482–1489. DOI: 10.1002/ajmg.a.36481

904. Stolk, P. Rare essentials: drugs for rare diseases as essential medicines / P. Stolk, M.J. Willemen, H.G. Leufkens // *Bull. World Health Organ.* – 2006. – Vol. 84, no. 9. – Pp. 745–751. DOI: 10.2471/blt.06.031518
905. Stöllberger, C. Frequency of Stroke and Embolism in Left Ventricular Hypertrabeculation/Noncompaction / noncompaction / C. Stöllberger, G. Blazek, C. Dobias [et al.] // *Am. J. Cardiol.* – 2011. – Vol. 108, no. 7. – Pp. 1021–1023. DOI: 10.1016/j.amjcard.2011.05.039
906. Stöppler, M.C. Genetic diseases (Disorder Definition, Types, and Examples) / M.C. Stöppler; W.C. Shiel Jr. (Ed.). – Available at: https://www.medicinenet.com/genetic_disease/article.htm .
907. Strothotte, S. Enzyme replacement therapy with alglucosidase alfa in 44 patients with late-onset glycogen storage disease type 2: 12-month results of an observational clinical trial / S. Strothotte, N. Strigl-Pill, B. Grunert [et al.] // *J. Neurol.* – 2010. – Vol. 257, no. 1. – Pp. 91–97. DOI: 10.1007/s00415-009-5275-3.
908. Sugie, H. Novel exon 11 skipping mutation in a patient with glycogen storage disease type IIIId / H. Sugie, T. Fukuda, M. Ito [et al.] // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2001. – Vol. 24, no. 5. – Pp. 535–545. DOI: 10.1023/a:1012459625902
909. Sun, B. Hydrostatic isolated limb perfusion with adeno-associated virus vectors enhances correction of skeletal muscle in Pompe disease / B. Sun, S. Li, A. Bird, D.D. Koeberl // *Gene Ther.* – 2010. – Vol. 17, no. 12. – Pp. 1500–1505. DOI: 10.1038/gt.2010.109
910. Suzuki, Y. Retinitis pigmentosa and mucopolysaccharidosis type II: an extremely attenuated phenotype / Y. Suzuki, A. Aoyama, T. Kato [et al.] // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2009. – Vol. 32, no. 4. – Pp. 582–583. DOI: 10.1007/s10545-009-1204-y
911. Swanson, T.A. *Biochemistry and Molecular Biology* / T.A. Swanson, S.I. Kim, M.J. Glucksman. – 4th ed. – Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2007. – 484 p.
912. Sweetman, L. Naming and Counting Disorders (Conditions) Included in Newborn Screening Panels / L. Sweetman, D.S. Millington, B.L. Therrell [et al.] // *Pediatrics.* – 2006. – Vol. 117, no. 5, pt. 2. – Pp. 308–314. DOI: 10.1542/peds.2005-2633j
913. Symoens, S. Type I Procollagen C – propeptide defects: Study of genotype–phenotype correlation and predictive role of crystal structure / S. Symoens, D.J. Hulmes, J.M. Bourhis [et al.] // *Hum. Mutat.* – 2014. – Vol. 35, no. 11. – Pp. 1330–1341. DOI: 10.1002/humu.22677
914. Tajima, Y. Structural and biochemical studies on Pompe disease and a “pseudodeficiency of acid α -glucosidase” / Y. Tajima, F. Matsuzawa, S. Aikawa [et al.] // *J. Hum. Genet.* – 2007. – Vol. 52, no. 11. – Pp. 898–906. DOI: 10.1007/s10038-007-0191-9
915. Takagi, M. Severe osteogenesis imperfecta caused by double glycine substitutions near the amino-terminal triple helical region in COL1A2 / M. Takagi, M. Kouwaki, K. Kawase [et al.] // *Am J Med Genet Part A.* – 2015. – Vol. 167A, no. 7. – Pp. 2851–2854. DOI: 10.1002/ajmg.a.37051
916. Takahashi, K. Heterogeneous mutations in the glucose-6-phosphatase gene in Japanese patients with glycogen storage disease type Ia / K. Takahashi, J. Akanuma, Y. Matsubara [et al.] // *Am. J. Med. Genet.* – 2000. – Vol. 92, no. 2. – Pp. 90–94.
917. Talente, G.M. Glycogen Storage Disease in Adults / G.M. Talente, R.A. Coleman, C. Alter [et al.] // *Ann. Intern. Med.* – 1994. – Vol. 120, no. 3. – Pp. 218–226. DOI: 10.7326/0003-4819-120-3-199402010-00008

918. Tamargo, J. TGFβ3 Mutations Cause Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia Type 1 and Open the Door to Understanding the Biological Role of TGFβ3 (Where There's a Will, There's a Way) / J. Tamargo // *Cardiovasc. Res.* – 2012. – Vol. 96. – Pp. 188–190. DOI: 10.1093/cvr/cvs231
919. Taranta, A. Analysis of CTNS gene transcripts in nephropathic cystinosis / A. Taranta, M.J. Wilmer, L.P. van den Heuvel [et al.] // *Pediatr. Nephrol.* – 2010. – Vol. 25, no. 7. – Pp. 1263–1267. DOI: 10.1007/s00467-010-1502-5.
920. Tarshish, P. Prognostic significance of the early course of minimal change nephrotic syndrome: report of the International Study of Kidney Disease in Children / P. Tarshish, J.N. Tobin, J. Bernstein, C.M. Edelmann Jr. // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 1997. – Vol. 8, no. 5. – Pp. 769–776.
921. Tartaglia, M. Noonan syndrome and related disorders: Genetics and Pathogenesis / M. Tartaglia, B.D. Gelb // *Annu. Rev. Genomics. Hum. Genet.* – 2005. – Vol. 6. – Pp. 45–68. DOI: 10.1146/annurev.genom.6.080604.162305
922. Tay, W. Symmetrical changes in the region of the yellow spot in each eye of an infant / W. Tay // *Trans. Ophthalmol. Soc.* – 1881. – Vol. 1. – Pp. 55–57.
923. Tayebi, N. Reciprocal and Nonreciprocal Recombination at the Glucocerebrosidase Gene Region: Implications for Complexity in Gaucher Disease / N. Tayebi, B.K. Stubblefield, J.K. Park [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2003. – Vol. 72. – Pp. 519–534. DOI: 10.1086/367850
924. Teare, D. Asymmetrical hypertrophy of the heart in young adults / D. Teare // *Br. Heart J.* – 1958. – Vol. 20, no. 1. – Pp. 1–8. DOI: 10.1136/hrt.20.1.1
925. Techakittiroj, C. High protein diet mimics hypertyrosinemia in newborn infants / C. Techakittiroj, A. Cunningham, P.F. Hooper [et al.] // *J. Pediatr.* – 2005. – Vol. 146, no. 2. – Pp. 281–282. DOI: 10.1016/j.jpeds.2004.10.013
926. Teekakirikul, P. Inherited cardiomyopathies. molecular genetics and clinical genetic testing in the postgenomic era / P. Teekakirikul, M. Kelly, H. Rehm [et al.] // *J. Mol. Diagnos.* – 2013. – Vol. 15, no. 2. – Pp. 160–170. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2012.09.002
927. Terlato, N.J. Can mucopolysaccharidosis type I disease severity be predicted on a patient's genotype? A comprehensive review of the literature / N.J. Terlato, G.F. Cox // *Genet. Med.* – 2003. – Vol. 5, no. 4. – Pp. 286–294. DOI: 10.1097/01.GIM.0000078027.83236.49
928. The primary nephrotic syndrome in children. Identification of patients with minimal change nephrotic syndrome from initial response to prednisone : A Report of the International Study of Kidney Disease in Children // *J. Pediatr.* – 1981. – Vol. 98, no. 4. – Pp. 561–564. DOI: 10.1016/s0022-3476(81)80760-3
929. Theis, J.L. Echocardiographic-determined septal morphology in Z-disc hypertrophic cardiomyopathy / J.L. Theis, J.M. Bos, V.B. Bartleson [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2006. – Vol. 351, no. 4. – Pp. 896–902. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.10.119
930. Theodoropoulos, D.S. Medullary nephrocalcinosis in nephropathic cystinosis / D.S. Theodoropoulos, T.H. Shawker, C. Heinrichs, W.A. Gahl // *Pediatr. Nephrol.* – 1995. – Vol. 9, no. 4. – Pp. 412–418. DOI: 10.1007/bf00866713
931. Thermo Fisher Scientific. – Available at: <https://www.thermofisher.com>.
932. Thermo Fisher Scientific. CytoScan™ Assay. User Guide. Manual Workflow. – Available at: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/703038_cytoScan_assay_UG.pdf.

933. Thermo Fisher Scientific. Ion 540™ Kit – Chef. User Guide. – Available at: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0010851_Ion_540_Kit_Chef_UG.pdf.
934. Thermo Fisher Scientific. Ion AmpliSeq™ Library Preparation on the Ion Chef™ System. User Guide. – Available at: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0013432_Ion_AmpliSeq_Library_Prep_on_Ion_Chef_UG.pdf.
935. Thermo Fisher Scientific. Ion S5™ and Ion S5™ XL Instrument. User Guide. – Available at: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0010811_Ion_S5_S5XL_Instrument_UG.pdf.
936. Thoene, J.G. Cystinosis. Intracellular cystine depletion by aminothiols in vitro and in vivo / J.G. Thoene, R.G. Oshima, J.C. Crawhall [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 1976. – Vol. 58, no. 1. – Pp. 180–189. DOI: 10.1172/JCI108448
937. Thomas, A.S. Gaucher disease: haematological presentations and complications / A.S. Thomas, A. Mehta, D.A. Hughes // *Br. J. Haematol.* – 2014. – Vol. 165, no. 4. – Pp. 427–440. DOI:10.1111/bjh.12804
938. Thomas, J.A. Childhood onset of Scheie syndrome, the attenuated form of mucopolysaccharidosis I / J.A. Thomas, M. Beck, J.T. Clarke, G.F. Cox // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2010. – Vol. 33, no. 4. – Pp. 421–427. DOI: 10.1007/s10545-010-9113-7
939. Thompson, D. RAF1 variants causing biventricular hypertrophic cardiomyopathy in two preterm infants: further phenotypic delineation and review of literature / D. Thompson, J. Patrick-Esteve, J.W. Surcouf [et al.] // *Clin. Dysmorphol.* – 2017. – Vol. 26, no. 4. – Pp. 195–199. DOI: 10.1097/MCD.000000000000194
940. Thon, V.J. Isolation of human glycogen branching enzyme cDNAs by screening complementation in yeast / V.J. Thon, M. Khalil, J.F. Cannon // *J. Biol. Chem.* – 1993. – Vol. 268, no. 10. – Pp. 7509–7513. – Available at: <https://www.researchgate.net/publication/14736592>.
941. Thurberg, B.L. Characterization of pre- and post-treatment pathology after enzyme replacement therapy for pompe disease / B.L. Thurberg, M.C. Lynch, C. Vaccaro [et al.] // *Lab. Invest.* – 2006. – Vol. 86, no. 12. – Pp. 1208–1220. DOI: 10.1038/labinvest.3700484
942. Tian, T.A low prevalence of sarcomeric gene variants in a Chinese cohort with left ventricular non-compaction / T. Tian, J. Wang, H. Wang [et al.] // *Heart Vessels.* – 2015. – Vol. 30, no. 2. – Pp. 258–264. DOI: 10.1007/s00380-014-0503-x
943. Tikhomirov, E. Novel human pathological mutations. Gene symbol: NPHS2. Disease: steroid-resistant nephrotic syndrome / E. Tikhomirov, N. Averyanova, G. Bayazutdinova [et al.] // *Hum Genet.* – 2007. – Vol. 122, no. 5. – Pp. 549.
944. Timms, K.M. Molecular and phenotypic variation in patients with severe Hunter syndrome / K.M. Timms, M.L. Bondeson, M.A. Ansari-Lari [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* – 1997. – Vol. 6, no. 3. – Pp. 479–486. DOI: 10.1093/hmg/6.3.479
945. Topaloglu, R. Genetic basis of cystinosis in Turkish patients: a single-center experience / R. Topaloglu, T. Vilboux, T. Coskun [et al.] // *Pediatr. Nephrol.* – 2012. – Vol. 27, no. 1. – Pp. 115–121. DOI: 10.1007/s00467-011-1942-6
946. Tory, K. Mutation-dependent recessive inheritance of NPHS2-associated steroid-resistant nephrotic syndrome / K. Tory, D.K. Menyhard, S. Woerner [et al.] // *Nat. Genet.* – 2014. – Vol. 46, no. 3. – Pp. 299–304. DOI: 10.1038/ng.2898



947. Touchman, J.W. The genomic region encompassing the nephropathic cystinosis gene (CTNS): complete sequencing of a 200-kb segment and discovery of a novel gene within the common cystinosis-causing deletion / J.W. Touchman, Y. Anikster, N.L. Dietrich [et al.] // *Genome. Res.* – 2000. – Vol. 10, no. 2. – Pp. 165–173. DOI: 10.1101/gr.10.2.165.
948. Town, M. A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis / M. Town, G. Jean, S. Cherqui [et al.] // *Nat. Genet.* –1998. – Vol. 18, no. 4. – Pp. 319–324. DOI: 10.1038/ng0498-319
949. Trautmann, A. Spectrum of Steroid-Resistant and Congenital Nephrotic Syndrome in Children: The PodoNet Registry Cohort / A. Trautmann, M. Bodria, F. Ozaltin [et al.] // *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* –2015. – Vol. 10, no. 4. – Pp. 592–600. DOI: 10.2215/CJN.06260614.
950. Triggvasson, K. Hereditary Proteinuria Syndromes and Mechanisms of Proteinuria / K. Triggvasson, J. Patrakka, J. Wartiovarra // *N. Engl. J. Med.* – 2006. – Vol. 354, no. 3. – Pp. 1387–1401. DOI: 10.1056/NEJMra052131
951. Tsilianidis, L.A. Aggressive therapy improves cirrhosis in glycogen storage disease type IX / L.A. Tsilianidis, L.M. Fiske, S. Siegel [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* – 2013. – Vol. 109, no. 2. – Pp. 179–182. DOI: 10.1016/j.ymgme.2013.03.009
952. Tsukaguchi, H. NPHS2 mutations in late-onset focal segmental glomerulosclerosis: R229Q is a common disease-associated allele / H. Tsukaguchi, A. Sudhakar, T.C. Le [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2002. – Vol. 110, no. 11. – Pp. 1659–1666. DOI: 10.1172/JCI16242
953. Tuschl, K. Mucopolysaccharidosis type II in females: Case report and review of literature / K. Tuschl, A. Gal, E. Paschke [et al.] // *Pediatr. Neurol.* – 2005. – Vol. 32, no. 4. – Pp. 270–272. DOI: 10.1016/j.pediatrneurol.2004.10.009
954. Tylki-Szymanska, A. Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis II from 3 months of age: a 3-year follow-up / A. Tylki-Szymanska, A. Jurecka, Z. Zuber [et al.] // *Acta Paediatr.* –2012. – Vol. 101, no. 1. – Pp. e42–e47. DOI: 10.1111/j.1651-2227.2011.02385.x
955. Tylki-Szymanska, A. Types I and III Gaucher disease in Poland: Incidence of the most common mutations and phenotypic manifestations / A. Tylki-Szymanska, G. Millat, I. Maire [et al.] // *Eur. J. Hum. Genet.* – 1996. – Vol. 4, no. 6. – Pp. 334–337. DOI: 10.1159/000472228
956. Uçar, H.K. Case Report of a Very Rare Association of Tyrosinemia type I and Pancreatitis Mimicking Neurologic Crisis of Tyrosinemia Type I / H.K. Uçar, G. Tümgör, D. Kör [et al.] // *Balkan. Med. J.* – 2016. – Vol. 33, no. 3. – Pp. 370–372. DOI: 10.5152/balkanmedj.2016.141074
957. Valstar, M.J. Sanfilippo syndrome: A mini-review / M.J. Valstar, G.J. Ruijter, O.P. van Diggelen [et al.] // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2008. – Vol. 31, no. 2. – Pp. 240–252. DOI: 10.1007/s10545-008-0838-5
958. Van Berkel, Y. Proteinuria in Dent disease: a review of the literature / Y. Van Berkel, M. Ludwig, J.A. van Wijk [et al.] // *Pediatr. Nephrol.* – 2017. – Vol. 32, no. 10 – Pp. 1851–1859. DOI: 10.1007/s00467-016-3499-x
959. Van Capelle, C.I. Hearing loss in Pompe disease revisited: results from a study of 24 children / C.I. Van Capelle, A. Goedegebure, N.C. Homans [et al.] // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2010. – Vol. 33, no. 5. – Pp. 597–602. DOI: 10.1007/s10545-010-9144-0
960. Van den Berg, I.E. X-linked liver phosphorylase kinase deficiency is associated with mutations in the human liver phosphorylase kinase alpha subunit / I.E. van den Berg,

E.A. van Beurden, H.E. Malingré [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 1995. – Vol. 56, no. 2. – Pp. 381–387.

961. Van den Hout, H.M. The natural course of infantile Pompe's disease: 20 original cases compared with 133 cases from the literature / H.M. van den Hout, W.Hop, O.P. van Diggelen [et al.] // *Pediatrics.* – 2003. – Vol. 112, no. 2. – Pp. 332–1340. DOI: 10.1542/peds.112.2.332

962. Van der Beek, N.A. Rate of progression and predictive factors for pulmonary outcome in children and adults with Pompe disease / N.A. van der Beek, C.I. van Capelle, K.I. van der Velden-van Etten [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* – 2011 – Vol. 104, no. 1-2. – Pp. 129–136. DOI: 10.1016/j.ymgme.2011.06.012

963. Van der Ploeg, A.T. Pompe's disease / A.T. Van der Ploeg, A.J. Reuser // *Lancet.* – 2008. – Vol. 372, no. 9646. – Pp. 1342–1353. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)61555-X

964. Van der Tol, L. A systematic review on screening for Fabry disease: prevalence of individuals with genetic variants of unknown significance / L. van der Tol, B.E. Smid, B.J. Poorthuis [et al.] // *J. Med. Genet.* – 2014. – Vol. 51, no. 1. – Pp. 1–9. DOI: 10.1136/jmedgenet-2013-101857

965. Van der Zwaag, P.A. Clinical and genetic characterization of patients with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy caused by a plakophilin-2 splice mutation / P.A. van der Zwaag, J.P. van Tintelen, M.G. Cox [et al.] // *Cardiology.* – 2012. – Vol. 123, no. 3. – Pp. 181–189. DOI: 10.1159/000342717

966. Van Dijk, F.S. Osteogenesis imperfecta: Clinical diagnosis, nomenclature and severity assessment / F.S. van Dijk, D.O. Silience // *Am. J. Hum. Genet. A.* – 2014 – Vol. 164, no. 5. – Pp. 1470–1481. DOI: 10.1002/ajmg.a.36545

967. Van Dijk, F.S. PLS3 mutations in X-linked osteoporosis with fractures / F.S. van Dijk, M.C. Zillikens, D. Micha [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2013. – Vol. 369, no. 16. – Pp. 1529–1536. DOI: 10.1056/NEJMoal308223.

968. Van Dijk, F.S. PPIB mutations cause severe osteogenesis imperfecta / F.S. van Dijk, I.M. Nesbitt, E.H. Zwikstra [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2009. – Vol. 85, no. 4. – Pp. 521–527. DOI: 10.1016/j.ajhg.2009.09.001

969. Van Driest, S.L. Yield of genetic testing in hypertrophic cardiomyopathy / S.L. van Driest, S.R. Ommen, A.J. Tajik [et al.] // *Mayo. Clin. Proc.* – 2005. – Vol. 80, no. 6. – Pp. 739–744. DOI: 10.1016/S0025-6196(11)61527-9

970. Van Dussen, L. Modelling Gaucher disease progression: long-term enzyme replacement therapy reduces the incidence of splenectomy and bone complications / L. van Dussen, M. Biegstraaten, M.G. Dijkgraaf [et al.] // *Orphanet J. Rare Dis.* – 2014. – No. 9, art. num. 112. – 19 p. DOI: 10.1186/s13023-014-0112-x

971. Van Gelder, C.M. Facial-muscle weakness, speech disorders and dysphagia are common in patients with classic infantile Pompe disease treated with enzyme therapy / C.M. van Gelder, C.I. van Capelle, B.J. Ebbink [et al.] // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2012. – Vol. 35, no. 3. – Pp. 505–11. DOI: 10.1007/s10545-011-9404-7.

972. Van Heerebeek, L. Low myocardial protein kinase G activity in heart failure with preserved ejection fraction / L. van Heerebeek, N. Hamdani, I. Falcão-Pires [et al.] // *Circulation.* – 2012. – Vol. 126, no. 7. – Pp. 830–839. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.076075

973. Van Rijsingen, I.A. Gender-specific differences in major cardiac events and mortality in lamin A/C mutation carriers / I.A. van Rijsingen, E.A. Nannenberg, E. Arbustini [et al.] // *Eur. J. Heart Fail.* – 2013. – Vol. 15, no. 4. – Pp. 376–384. DOI: 10.1093/eurjhf/hfs191
974. Van Spaendonck-Zwarts, K. Titin gene mutations are common in families with both peripartum cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy / K. van Spaendonck-Zwarts, A. Posafalvi, M. van den Berg. [et al.] // *Eur. Heart J.* – 2014. – Vol. 35, no. 32. – Pp. 2165–2173. DOI: 10.1093/eurheartj/ehu050
975. Van Spaendonck-Zwarts, K.Y. Genetic analysis in 418 index patients with idiopathic dilated cardiomyopathy: overview of 10 years' experience / K.Y. van Spaendonck-Zwarts, I.A. van Rijsingen, M.P. van den Berg, [et al.] // *Eur. J. Heart Fail.* – 2013. – Vol. 15, no. 6. – Pp. 628–636. DOI: 10.1093/eurjhf/hft013
976. Van Spaendonck-Zwarts, K.Y. Peripartum cardiomyopathy as a part of familial dilated cardiomyopathy / K.Y. van Spaendonck-Zwart, J.P. van Tintelen, D.J. van Veldhuisen [et al.] // *Circulation.* – 2010. – Vol. 121, no. 20. – Pp. 2169–2175. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.929646
977. Van Spronsen, F.J. Hereditary tyrosinemia type I: a new clinical classification with difference in prognosis on dietary treatment / F.J. van Spronsen, Y. Thomasse, G.P. Smit [et al.] // *Hepatology.* – 1994. – Vol. 20, no. 5. – Pp. 1187–1191
978. Van Velzen, H.G. Outcomes of Contemporary Family. Screening in Hypertrophic Cardiomyopathy / H.G. van Velzen, A.F. L. Schinkel, S.J. Baart [et al.] // *Circ. Genom. Precis. Med.* – 2018. – Vol. 11, no. 4, e001896. DOI: 10.1161/CIRCGEN.117.001896
979. Van Waning, J. Genetics, Clinical Features, and Long-Term Outcome of Noncompaction Cardiomyopathy / J. van Waning, K. Caliskan, Y. Hoedemaekers [et al.] // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2018. – Vol. 71, no. 7 – Pp. 711–722. DOI: 10.1016/j.jacc.2017.12.019
980. Vanclooster, A. Pregnancy during nitisinone treatment for tyrosinaemia type I: first human experience / A. vanclooster, R. Devlieger, W. Meersseman [et al.] // *JIMD Rep.* – 2012. – Vol. 5. – Pp. 27–33. DOI: 10.1007/8904_2011_88
981. Varnava, A. A new mutation of the cardiac troponin T gene causing familial hypertrophic cardiomyopathy without left ventricular hypertrophy / A. Varnava, C. Baboonian, F. Davison [et al.] // *Heart.* – 1999. – Vol. 82, no. 5. – Pp. 621–624. DOI: 10.1136/hrt.82.5.621
982. Vasile, V.C. A missense mutation in a ubiquitously expressed protein, vinculin, confers susceptibility to hypertrophic cardiomyopathy / V.C. Vasile, S.R. Ommen, W.D. Edwards [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2006. – Vol. 345, no. 3. – Pp. 998–1003. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.04.151
983. Vedder, A.C. Treatment of Fabry disease: outcome of a comparative trial with agalsidase alfa or beta at a dose of 0.2 mg/kg / A.C. Vedder, G.E. Linthorst, G. Houge [et al.] // *PLoS One.* – 2007. – Vol. 2, no. 7, e598. DOI: 10.1371/journal.pone.0000598
984. Vega, A. Molecular diagnosis of glycogen storage disease and disorders with overlapping clinical symptoms by massive parallel sequencing / A. Vega, C. Medrano, R. Navarrete [et al.] // *Genet. Med.* – 2016. – Vol. 18, no. 10. – Pp. 1037–1043. DOI: 10.1038/gim.2015.217
985. Vellodi, A. Long-term follow-up following bone marrow transplantation for Hunter disease / A. Vellodi, E. Young, A. Cooper [et al.] // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 1999. – Vol. 22, no. 5. – Pp. 638–648. DOI: 10.1023/a:1005525931994

986. Vikstrom, K.L. Contractile protein mutations and heart disease / K.L. Vikstrom, L.A. Leinwand // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 1996. – Vol. 8, no. 1. – Pp. 97–105. DOI: 10.1016/s0955-0674(96)80053-6
987. Viljoen, D. Osteogenesis imperfecta type III: an ancient mutation in Africa? / D. Viljoen, P. Beighton // *Am. J. Med. Genet.* – 1987. – Vol. 27, no. 4. – Pp. 907–912. DOI: 10.1002/ajmg.1320270417
988. Villard, E. Mutation screening in dilated cardiomyopathy: prominent role of the beta myosin heavy chain gene / E. Villard, L. Duboscq-Bidot, P. Charron [et al.] // *Eur. Heart J.* – 2005. – Vol. 26, no. 8. – Pp. 794–803. DOI: 10.1093/eurheartj/ehi193
989. Vitner, E.B. Contribution of brain inflammation to neuronal cell death in neuronopathic forms of Gaucher's disease / E.B. Vitner, T. Farfel-Becker, R. Eilam [et al.] // *Brain.* – 2012. – Vol. 135, no. 6. – Pp. 1724–1735. DOI: 10.1093/brain/aws095
990. Vivante, A. Exome Sequencing Frequently Reveals the Cause of Early-Onset Chronic Kidney Disease / A. Vivante, F. Hildebrandt // *Nat. Rev. Nephrol.* – 2016. – Vol. 12, no. 3. – Pp.133–146. DOI:10.1038/nrneph.2015.205
991. Vivarelli, M. Time of initial response to steroids is a major prognostic factor in idiopathic nephrotic syndrome / M. Vivarelli, E. Moscaritollo, A. Tsalkidis [et al.] // *J. Pediatr.* – 2010. – Vol. 156, no. 6. – Pp. 965–971. DOI: 10.1016/j.jpeds.2009.12.020
992. Vogel, B. Multivariate miRNA signatures as biomarkers for non-ischaemic systolic heart failure / B. Vogel, A. Keller, K.S. Frese [et al.] // *Eur. Heart J.* – 2013. – Vol. 34, no. 36. – Pp. 2812–2822. DOI: 10.1093/eurheartj/eh256
993. Vollebregt, A. Genotype-phenotype relationship in mucopolysaccharidosis II: predictive power of IDS variants for the neuronopathic phenotype / A. Vollebregt, M. Hoogeveen-Westerveld, M. Kroos [et al.] // *Dev. Med. Child Neurol.* – 2017. – Vol. 59, no 10. – Pp. 1063–1070. DOI: 10.1111/dmcn.13467
994. Von Gierke, E. Hepato-nephromegaliaglykogenica (Glykogenspeicherkrankheit der Leber und Nieren) / E. von Gierke // *Beitr. Pathol. Anat.* – 1929. – Vol. 82. Pp. – 497–513.
995. Vondrackova A. Clinical, biochemical and molecular characteristics in 11 Czech children with tyrosinemia type I / A. Vondrackova, M. Tesarova, M. Magner [et al.] // *Cas. Lek. Cesk.* – 2010. – Vol. 149, no. 9. – Pp. 411–416.
996. Voskoboeva, E.Y. Molecular genetics of mucopolysaccharidosis type I: mutation analysis among the patients of the former Soviet Union / E.Y. Voskoboeva, X.D. Krasnopol'skaya, T.V. Mirenburg [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* – 1998. – Vol. 65, no. 2. – Pp. 174–180. DOI: 10.1006/mgme.1998.2745
997. Waldek, S. Life expectancy and cause of death in males and females with Fabry disease: findings from the Fabry Registry / S. Waldek, M.R. Patel, M. Bankiazemi [et al.] // *Genet. Med.* – 2009. – Vol. 11, no. 11 – Pp. – 790–796. DOI: 10.1097/GIM.0b013e3181bb05bb
998. Walley, A.J. Gaucher's disease in the United Kingdom: screening non-Jewish patients for the two common mutations / A.J. Walley, M.L. Barth, L. Ellis [et al.] // *J. Med. Genet.* – 1993. – Vol. 30, no. 4. – Pp. 280–283. DOI: 10.1136/jmg.30.4.280
999. Walsh, R. Reassessment of mendelian gene pathogenicity using 7,855 cardiomyopathy cases and 60,706 reference samples / R. Walsh, K.L. Thomson, J.S. Ware [et al.] // *Gen. Med.* – 2017. – Vol. 19, no. 2. – Pp. 192–203. DOI: 10.1038/gim.2016.90



1000. Wang, F. Spectrum of mutations in Chinese children with steroid-resistant nephrotic syndrome / F. Wang, Y. Zhang, J. Mao [et al.] // *Pediatr. Nephrol.* – 2017. – Vol. 32, no. 7. – Pp. 1181–1192. DOI: 10.1007/s00467-017-3590-y
1001. Wang, J. Clinical application of massively parallel sequencing in the molecular diagnosis of glycogen storage diseases of genetically heterogeneous origin / J. Wang, H. Cui, N. Lee [et al.] // *Genet. Med.* – 2013. – Vol. 15, no. 2 – Pp. 106–114. DOI: 10.1038/gim.2012.104
1002. Wang, R.Y. ACMG work group on diagnostic confirmation of lysosomal storage diseases. Lysosomal storage diseases: diagnostic confirmation and management of presymptomatic individuals / R.Y. Wang, O.A. Bodamer, M.S. Watson [et al.] // *Genet. Med.* – 2011. – Vol. 13, no. 5. – Pp. 457–484. DOI: 10.1097/GIM.0b013e318211a7e1
1003. Wang, R.Y. Heterozygous Fabry women are not just carriers, but have a significant burden of disease and impaired quality of life / R.Y. Wang, A. Lelis, J. Mirocha [et al.] // *Genet. Med.* – 2007. – Vol. 9, no. 1. – Pp. 34–45. DOI: 10.1097/gim.0b013e31802d8321
1004. Wang, X. Mucopolysaccharidosis I mutations in Chinese patients: identification of 27 novel mutations and 6 cases involving prenatal diagnosis / X. Wang, W. Zhang, H. Shi [et al.] // *Clin. Genet.* – 2012. – Vol. 81, no. 5. – Pp. 443–452. DOI: 10.1111/j.1399-0004.2011.01680.x
1005. Ward, L.M. Osteogenesis imperfecta type VII: an autosomal recessive form of brittle bone disease / L.M. Ward, F. Rauch, R. Travers [et al.] // *Bone.* – 2002. – Vol. 31, no. 1. – Pp. 12–18. DOI: 10.1016/s8756-3282(02)00790-1
1006. Warejko, J.K. Whole Exome Sequencing of Patients with Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome / J.K. Warejko, W. Tan, A. Daga [et al.] // *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* – 2018. – Vol. 13, no 1. – Pp. 53–62. DOI: 10.2215/CJN.04120417
1007. Warman, M.L. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2010 revision / M.L. Warman, V. Cormier-Daire, C. Hall [et al.] // *Am. J. Med. Genet. A.* – 2011. – Vol. 155, no. 5. – Pp. 943–968. DOI: 10.1002/ajmg.a.33909
1008. Warnock, D.G. Oral migalastat HCL leads to greater systemic exposure and tissue levels of active α -galactosidase a in Fabry patients when co-administered with infused agalsidase / D.G. Warnock, D.G. Bichet, M. Holida [et al.] // *PLoS ONE.* – 2015. – Vol. 10, no. 8, e0134341. – 17 p. DOI: 10.1371/journal.pone.0134341
1009. Watkins, H. Inherited cardiomyopathies / H. Watkins, H. Ashrafian, C. Redwood // *N. Engl. J. Med.* – 2011. – Vol. 364, no. 17 – Pp. 1643–1656. DOI: 10.1056/NEJMra0902923
1010. Watkins, H. Mutations in the genes for cardiac troponin T and alpha-tropomyosin in hypertrophic cardiomyopathy / H. Watkins, W.J. McKenna, L. Thierfelder [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 1995. – Vol. 332, no.16. – Pp. 1058–1064. DOI: 10.1056/NEJM199504203321603
1011. Webber, S.A. Pediatric Cardiomyopathy Registry Investigators. Outcomes of restrictive cardiomyopathy in childhood and the influence of phenotype: a report from the Pediatric Cardiomyopathy Registry / S.A. Webber, S.E. Lipshultz, L.A. Sleeper, [et al.] // *Circulation.* – 2012. – Vol. 126, no. 10 – Pp. 1237–1244. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.104638
1012. Weidemann, F. Long-term outcome of enzyme-replacement therapy in advanced Fabry disease: evidence for disease progression towards serious complications / F. Weidemann, M. Niemann, S. Stork [et al.] // *J. Intern. Med.* – 2013. – Vol. 274, no. 4. – Pp. 331–341. DOI: 10.1111/joim.12077

1013. Welsh, G.I. The podocyte cytoskeleton: key to a functioning glomerulus in health and disease / G.I. Welsh, M.A. Saleem // *Nat. Rev. Nephrol.* – 2011. – Vol. 8, no. 1. – Pp. 14–21. DOI: 10.1038/nrneph.2011.151
1014. Wenger, D.A. Screening for Lysosomal Disorders, in *Techniques on Diagnostic Human Biochemical Genetics* / D.A. Wenger, C. Williams // *Hommes F.A. A Laboratory Manual* / F.A. Hommes (ed.). – New York: Wiley-Liss, 1991. Pp. – 587–617.
1015. Wens, S.C. Phenotypical variation within 22 families with Pompe disease / S.C. Wens, C.M. van Gelder, M.E. Kruijshaar [et al.] // *Orphanet J. Rare Dis.* – 2013. – No. 8, art. num. 182. – 6 p. DOI: 10.1186/1750-1172-8-182
1016. Weston, B.W. Glucose-6-phosphatase mutation G188R confers an atypical glycogen storage disease type 1b phenotype / B.W. Weston, J.L. Lin, J. Muenzer [et al.] // *Pediatr. Res.* – 2000. – Vol. 48, no. 3. – Pp. 329–334. DOI: 10.1203/00006450-200009000-00011
1017. Wiczorek, A. Dentinogenesis imperfecta – hardness and Young’s modulus of teeth / A. Wiczorek, J. Loster, W. Ryniewicz [et al.] // *Acta Bioeng. Biomech.* – 2013. – Vol. 15, no. 3. – Pp. 65–69.
1018. Wigle, E. Idiopathic ventricular septal hypertrophy causing muscular subaortic stenosis / E. Wigle, R. Heimbecker, R. Gunton // *Circulation.* – 1962. – Vol. 26. – Pp. 325–340. DOI: 10.1161/01.cir.26.3.325
1019. Wilkinson, J.D. Lessons learned from the Pediatric Cardiomyopathy Registry (PCMR) Study Group / J.D. Wilkinson, J.A. Westphal, N. Bansal [et al.] // *Cardiol. Young.* – 2015. – Vol. 25, no. 2. – Pp. 140–153. DOI: 10.1017/S1047951115000943
1020. Willig, L.K. Whole-genome sequencing for identification of Mendelian disorders in critically ill infants: a retrospective analysis of diagnostic and clinical findings / L.K. Willig, J.E. Petrikin, L.D. Smith [et al.] // *Lancet Respir. Med.* – 2015. – Vol. 3, no. 5. – Pp. 377–387. DOI: 10.1016/S2213-2600(15)00139-3
1021. Willing, M.C. Premature chain termination is a unifying mechanism for COL1A1 null alleles in osteogenesis imperfecta type I cell strains / M.C. Willing, S.P. Deschenes, R.L. Slayton [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 1996. – Vol. 59, no. 4. – Pp. 799–809.
1022. Willot, S. Systemic progression of type IV glycogen storage disease after liver transplantation / S. Willot, V. Marchand, A. Rasquin [et al.] // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* – 2010. – Vol. 51, no. 5. – Pp.661–664. DOI: 10.1097/MPG.0b013e3181d29780
1023. Wilmer, M.J. Cystinosis: practical tools for diagnosis and treatment / M.J. Wilmer, J.P. Schoeber, L.P. van den Heuvel [et al.] // *Pediatr. Nephrol.* – 2011. – Vol. 26, no. 2. – Pp. 205–215. DOI: 10.1007/s00467-010-1627-6
1024. Wilmer, M.J. The pathogenesis of cystinosis: mechanisms beyond cystine accumulation / M.J. Wilmer, F. Emma, E.N. Levtchenko // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* – 2010. – Vol. 299, no. 5. – Pp. F905–F916. DOI: 10.1152/ajprenal.00318.2010
1025. Winchester, B. Biochemical and genetic diagnosis of Fabry disease / B. Winchester, E. Young // *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS.* – Oxford: Oxford PharmaGenesis, 2006. – Ch. 18.
1026. Winkel, L.P. The natural course of non-classic Pompe’s disease; a review of 225 published cases / L.P. Winkel, M.L. Hagemans, P.A. van Doorn [et al.] // *J. Neurol.* – 2005. – Vol. 252, no. 8. – Pp. 875–884. DOI: 10.1007/s00415-005-0922-9



1027. Wisselaar, H.A. Structural and functional changes of lysosomal acid alpha-glucosidase during intracellular transport and maturation / H.A. Wisselaar, M.A. Kroos, M.M. Hermans [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1993. – Vol. 268, no. 3. – Pp. 2223–2231.
1028. Wittmann, J. Newborn Screening for Lysosomal Storage Disorders in Hungary / J. Wittmann, E. Karg, S. Turi [et al.] // *JIMD Rep.* – 2012. – Vol. 6. – Pp. 117–125. DOI: 10.1007/8904_2012_130
1029. Wolfsdorf, J.I. Glycogen storage diseases / J.I. Wolfsdorf, D.A. Weinstein // *Rev. Endocr. Metab. Disord.* – 2003. – Vol. 4, no. 1. – Pp. 95–102. DOI: 10.1023/a:1021831621210
1030. Wong, W. Congenital nephrotic syndrome with prolonged renal survival without renal replacement therapy / W. Wong, M.C. Morris, T. Kara // *Pediatr. Nephrol.* – 2013. – Vol. 28, no. 12 – Pp. 2313–2321. DOI: 10.1007/s00467-013-2584-7
1031. Wong, W. Idiopathic nephrotic syndrome in New Zealand children demographic clinical features initial management and outcome after twelwemonths follow-up: results of a three year national surveillance study / W. Wong // *J. Paediatr. Child Health.* – 2007. – Vol. 43, no. 5. – Pp. 337–341. DOI: 10.1111/j.1440-1754.2007.01077.x
1032. Wordsworth, S. DNA testing for hypertrophic cardiomyopathy: a cost-effectiveness model / S. Wordsworth, J. Leal, E. Blair [et al.] // *Eur. Heart J.* – 2010. – Vol. 31, no. 8. – Pp. 926–935. DOI: 10.1093/eurheartj/ehq067
1033. World Health Organization. Regulatory Matters WHO Drug Information. – 1991. – Vol. 5, no. 3. – p 123.
1034. Wraith, J.E. Initial report from the Hunter Outcome Survey / J.E. Wraith, M. Beck, R. Giugliani [et al.] // *Genet. Med.* – 2008. – Vol. 10, no. 7. – Pp. 508–516. DOI: 10.1097/gim.0b013e31817701e6
1035. Wraith, J.E. Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): a clinical review and recommendations for treatment in the era of enzyme replacement therapy / J.E. Wraith, M. Scarpa, M. Beck [et al.] // *Eur. J. Pediatr.* – 2008. – Vol. 167, no. 3 – Pp. 267–277. DOI: 10.1007/s00431-007-0635-4
1036. Wraith, J.E. The clinical presentation of lysosomal storage disorders / J.E. Wraith // *Acta Neurol. Taiwan.* – 2004. – Vol. 13, no. 3. – Pp. 101–106.
1037. Wright, E.M. Brittle cornea syndrome: recognition, molecular diagnosis and management / E.M. Wright, L.F. Porter, H.L. Spencer [et al.] // *Orphanet J. Rare Dis.* – 2013. – No. 8, art. num. 68. – 11 p. DOI: 10.1186/1750-1172-8-68
1038. Wüllrich-Schmoll, A. Structure of the human gene encoding the phosphorylase kinase beta subunit (PHKB) / A. Wüllrich-Schmoll, M.W. Kilimann // *Eur. J. Biochem.* – 1996. – Vol. 238, no. 2. – Pp. 374–380. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1996.0374z.x
1039. Xu, T. Compound and digenic heterozygosity contributes to arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy / T. Xu, Z. Yang, M. Vatta [et al.] // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2010. – Vol. 55, no. 6. – Pp. 587–597. DOI: 10.1016/j.jacc.2009.11.020
1040. Xu, S. Coformulation of a novel human α -galactosidase a with the pharmacological chaperone AT1001 leads to improved substrate reduction in Fabry mice / S. Xu, Y. Lun, N. Brignol [et al.] // *Mol. Ther.* – 2015. – Vol. 23, no.7. – Pp. 1169–1181. DOI: 10.1038/mt.2015.87
1041. Yancovitz, M. Alkaptonuria / M. Yancovitz, R. Anolik, M.K. Pomeranz // *Dermatol. Online J.* – 2010. – Vol. 16, no. 11. – P. 6.

1042. Yasuda, M. Fabry disease: characterization of alpha-galactosidase A double mutations and the D313Y plasma enzyme pseudodeficiency allele / M. Yasuda, J. Shabbeer, S.D. Benson [et al.] // *Hum. Mutat.* – 2003. – Vol. 22, no. 6. – Pp. 486–492. DOI: 10.1002/humu.10275
1043. Yiginer, O. Noncompaction of the myocardium coexistent with vertebral hemangiomas / O. Yiginer, O. Uz, E. Kardesoglu, [et al.] // *Tex. Heart Inst. J.* – 2011. – Vol. 38, no. 2. – Pp. 212–213.
1044. Young, F.G. Claude Bernard and the discovery of glycogen; a century of retrospect / F.G. Young // *Br. Med. J.* – 1957. – Vol. 1, no. 5033. – Pp. 1431–1437. DOI: 10.1136/bmj.1.5033.1431
1045. Young, S.P. Assessing disease severity in Pompe disease: the roles of a urinary glucose tetrasaccharide biomarker and imaging techniques / S.P. Young, M. Piraud, J.L. Goldstein [et al.] // *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* – 2012. – Vok. 160C, no. 1. – Pp. 50–58. DOI: 10.1002/ajmg.c.31320
1046. Yu, C. Enzymatic Screening and Diagnosis of Lysosomal Storage Diseases / C. Yu, Q. Sun, H. Zhou // *N. Am. J. Med. Sci.* – 2013. – Vol. 6, no. 4. – Pp. 186–193. DOI: 10.7156/najms.2013.0604186
1047. Yu, J.R. Cryopyrin-associated periodic syndrome: an update on diagnosis and treatment response / J.R. Yu, K.S. Leslie // *Curr. Allergy Asthma Rep.* – 2011. – Vol. 11, no. 1. – Pp. 12–20. DOI: 10.1007/s11882-010-0160-9
1048. Zahka, K. Homozygous mutation of MYBPC3 associated with severe infantile hypertrophic cardiomyopathy at high frequency among the Amish / K. Zahka, K. Kalidas, M.A. Simpson [et al.] // *Heart.* – 2008. – Vol. 94, no. 10. – Pp. 1326–1330. DOI: 10.1136/hrt.2007.127241
1049. Zander, N.F. cDNA cloning and complete primary structure of skeletal muscle phosphorylase kinase (alpha subunit) / N.F. Zander, H.E. Meyer, E. Hoffmann-Posorske [et al.] // *Proc. Nat. Acad. Sci.* – 1988. – Vol. 85, no. 9. – Pp. 2929–2933. DOI: 10.1073/pnas.85.9.2929
1050. Zenker, M. Genetics of nephrotic syndrome: new insights into molecules acting at the glomerular filtration barrier / M. Zenker, E. Machuca, C. Antignac // *J. Mol. Med. (Berl).* – 2009. – Vol. 87, no. 9. – Pp. 849–857. DOI: 10.1007/s00109-009-0505-9
1051. Zhang, H. Comparison of maltose and acarbose as inhibitors of maltase-glucoamylase activity in assaying acid alpha-glucosidase activity in dried blood spots for the diagnosis of infantile Pompe disease / H. Zhang, H. Kallwass, S.P. Young [et al.] // *Genet Med.* – 2006. – Vol. 8, no. 5. – Pp. 302–306. DOI: 10.1097/01.gim.0000217781.66786.9b
1052. Zhang, J. Clinical and genetic characteristics of 17 Chinese patients with glycogen storage disease type IXa / J. Zhang, Y. Yuan, M. Ma [et al.] // *Gene.* – 2017. – Vol. 627. – Pp. 149–156. DOI: 10.1016/j.gene.2017.06.026
1053. Zhang, L. Efficient liver repopulation of transplanted hepatocyte prevents cirrhosis in a rat model of hereditary tyrosinemia type I / L. Zhang, Y. Shao, L. Li [et al.] // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 31460. DOI: 10.1038/srep31460
1054. Zhang, X.K. Multiplex enzyme assay screening of dried blood spots for lysosomal storage disorders by using tandem mass spectrometry / X.K. Zhang, C.S. Elbin, W.L. Chuang [et al.] // *Clin. Chem.* – 2008. – Vol. 54, no. 10. – Pp. 1725–1728. DOI: 10.1373/clinchem.2008.104711



1055. Zhang, Z.L. The identification of novel mutations in COL1A1, COL1A2, and LEPRE1 genes in Chinese patients with osteogenesis imperfecta / Z.L. Zhang, H. Zhang, Y. Ke [et al.] // *J. Bone Miner. Metab.* – 2012. – Vol. 30, no. 1. – Pp. 69–77. DOI: 10.1007/s00774-011-0284-6
1056. Zhu, Y. Conjugation of mannose 6-phosphate-containing oligosaccharides to acid alpha-glucosidase improves the clearance of glycogen in pompe mice / Y. Zhu, X. Li, J. Kyazike [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279, no. 48. – Pp. 50336–50341. DOI: 10.1074/jbc.M409676200
1057. Zhurkova, N. High Prevalence Noonan Syndrome in Russian Children with Hypertrophic Cardiomyopathy, Diagnosed by Next Generation Sequencing / N. Zhurkova, K. Savostyanov, A. Pushkov [et al.] // *Arch. Dis. Child.* – 2019. – Vol. 104, no. S3 (A1–A428). – P. A42. DOI: 10.1136/archdischild-2019-epa.99
1058. Zhurkova, N.V. 1P36 Deletion syndrome in children with cardiomyopathy: two clinical cases / N.V. Zhurkova, A.A. Pushkov, K.V. Savostyanov [et al.] // *Arch. Dis. Child.* – 2017. – Vol. 102, no. S2. – Pp. A63–A64. DOI: 10.1136/archdischild-2017-313273.165
1059. Zhytnik, L. Mutational analysis of COL1A1 and COL1A2 genes among Estonian osteogenesis imperfecta patients / L. Zhytnik, K. Maasalu, E. Reimann [et al.] // *Hum. Genomics.* – 2017. – Vol. 11, no. 1. – P. 19. DOI: 10.1186/s40246-017-0115-5
1060. Ziemssen, F. Novel missense mutations in the glycogen-branching enzyme gene in adult polyglucosan body disease / F. Ziemssen, E. Sindern, J.M. Schröder [et al.] // *Ann. Neurol.* – 2000. – Vol. 47, no. 4. – Pp. 536–540.
1061. Zimakas, P.J. Glycogen storage disease type III in Inuit children / P.J. Zimakas, C.J. Rodd // *CMAJ.* – 2005. – Vol. 172, no. 3. – Pp. 355–358. DOI: 10.1503/cmaj.1031589
1062. Zingone, A. Correction of glycogen storage disease type 1a in a mouse model by gene therapy / A. Zingone, H. Hiraiwa, C.J. Pan // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275, no. 2. – Pp. 828–832. DOI: 10.1074/jbc.275.2.828
1063. Zykovich, A. CTNS mutations in publicly-available human cystinosis cell lines / A. Zykovich, R. Kinkade, G. Royal [et al.] // *Mol. Genet. Metab. Rep.* – 2015. – Vol. 5. – Pp. 63–66. DOI: 10.1016/j.ymgmr.2015.10.007

ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России

ИНФОРМАЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ

НАУЧНОЕ ИЗДАНИЕ

Савостьянов К. В.

СОВРЕМЕННЫЕ АЛГОРИТМЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ
РЕДКИХ НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ
У РОССИЙСКИХ ПАЦИЕНТОВ

Выпускающий редактор У. Пугачёва
Литературный редактор М. Шошина
Верстка Е. Зиновьева

Подписано в печать 30.07.2022.
Формат 70x100/16. Усл. печ. л. 7,15.
Тираж 500 экз. Заказ 220031.

Отпечатано ООО «Полиграфист и издатель»
119501, г. Москва, ул. Веерная, 22-3-48

