

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Пушков А.А.¹, Мазанова Н.Н.^{1,2}, Кузенкова Л.М.¹, Журкова Н.В.¹, Глоба О.В.¹, Алексеева А.Ю.¹, Мигали А.В.¹, Сухоженко А.В.¹, Варичкина М.А.¹, Черняев В.В.², Асанов А.Ю.², Фисенко А.П.¹, Савостьянов К.В.¹

Молекулярная диагностика болезни Краббе у российских детей

¹ ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России, 119991, Москва, Россия;

² ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Москва, Россия

Введение. Болезнь Краббе (БК) – заболевание из группы лизосомных болезней накопления, возникающее вследствие снижения активности фермента галактозилцереброзидазы, обусловленной мутациями в гене *GALC* и приводящей к нарушению функционирования миелинообразующей ткани олигодендроцитов и леммоцитов. В настоящее время единственным возможным лечением БК является трансплантация гематопоэтических клеток, которую необходимо проводить до появления симптомов болезни, поэтому ранняя постановка диагноза имеет особую значимость.

Цель работы — изучить клинические, географические, биохимические и молекулярно-генетические характеристики российских больных с БК.

Материалы и методы. В исследование были включены 190 пациентов, поступивших на диагностику в лабораторию молекулярной генетики и медицинской геномики ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» в 2012–2019 гг. для исключения БК. Всем пациентам измерялась активность галактозилцереброзидазы в сухих пятнах крови с последующим поиском патогенных вариантов в гене *GALC* в случае выявления сниженной активности фермента. Концентрацию биомаркера гликозилсфингозина (лизо-Гл1) измеряли у 90 пациентов, включенных в исследование с 2016 г.

Результаты. У 9 пациентов активность фермента ($0,32 \pm 0,13$ мкмоль/л/ч) была снижена по сравнению с контрольной группой ($2,95 \pm 0,24$ мкмоль/л/ч; $p < 0,001$). У 5 пациентов выявлено завышение концентрации лизо-Гл1 ($12,50 \pm 1,57$ нг/мл) по сравнению с контрольной группой ($1,8 \pm 0,33$ нг/мл; $p < 0,005$). При подтверждении диагноза БК молекулярно-генетическими методами исследования у 3 пациентов из 9 выявлены патогенные варианты гена *GALC*, не описанные ранее: *c.265-2A>G*, *c.1036del* и *c.2037_2040del*.

Заключение. Измерение концентрации лизо-Гл1 может быть использовано в качестве дополнительного метода диагностики БК. Продемонстрирована высокая эффективность используемого алгоритма диагностики БК у российских детей.

Ключевые слова: болезнь Краббе; галактозилцереброзидаза; гликозилсфингозин; лизосомные болезни накопления; тандемная масс-спектрометрия; секвенирование; мутации гена *GALC*.

Для цитирования: Пушков А.А., Мазанова Н.Н., Кузенкова Л.М., Журкова Н.В., Глоба О.В., Алексеева А.Ю., Мигали А.В., Сухоженко А.В., Варичкина М.А., Черняев В.В., Асанов А.Ю., Фисенко А.П., Савостьянов К.В. Молекулярная диагностика болезни Краббе у российских детей. *Неврологический журнал имени Л.О. Бадаляна*. 2020; 1(1): 21-28. DOI: <https://doi.org/10.17816/2686-8997-2020-1-01-21-28>

Для корреспонденции: Пушков Александр Алексеевич — канд. биол. наук, введущ. науч. сотр. лаб. молекулярной генетики и медицинской геномики ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России. 119991, Москва.
E-mail: pushkovgenetika@gmail.com

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов:

Пушков А.А. – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, написание текста.

Мазанова Н.Н. – сбор и обработка материала, написание текста.

Кузенкова Л.М. – сбор и обработка материала.

Журкова Н.В. – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, написание текста.

Глоба О.В. – сбор и обработка материала.

Алексеева А.Ю. – статистическая обработка.

Мигали А.В. – сбор и обработка материала.

Сухоженко А.В. – сбор и обработка материала.

Варичкина М.А. – сбор и обработка материала.

Черняев В.В. – статистическая обработка.

Асанов А.Ю. – редактирование.

Фисенко А.П. – утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Савостьянов К.В. – концепция и дизайн исследования, написание текста, редактирование.

Все соавторы – утверждение окончательного варианта рукописи, ответственность за целостность всех частей рукописи.

Поступила: 14.01.2020

Принята к печати: 23.01.2020

Опубликована: 27.03.2020

Alexander A. Pushkov¹, Nataliya N. Mazanova^{1,2}, Lyudmila M. Kuzenkova¹, Nataliya V. Zhurkova¹, Oksana V. Globa¹, Alina Yu. Alexeeva¹, Alla V. Migali¹, Aleksey V. Sukhozhenko¹, Mariya A. Varichkina¹, Vasily V. Chernyaev V.V.², Aliy Yu. Asanov², Andrey P. Fisenko¹, Kirill V. Savostyanov¹

Molecular diagnostics of the Krabbe disease in Russian children

¹National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, 119991, Russian Federation;

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991, Russian Federation

Introduction. Krabbe disease (KD) is the lysosomal storage disease developed due to the decline of the galactocerebrosidase activity associated with mutations in the *GALC* gene. It leads to the development of oligodendrocytes and lemmocytes (Schwann cells) myelin-forming dysfunction. Nowadays the only possible treatment of KD is hemopoietic cell transplantation

which should be performed before the manifestation of any signs of disease. That is why laboratory diagnostics has special significance.

The aim of the study. To elaborate the algorithm of a molecular diagnostics of the Krabbe disease (KD) in Russian children.

Material and methods. 190 patients were diagnosed for the exclusion of KD during the period from 2012 to 2019. In all cases, there was measured a galactocerebrosidase activity in dry blood spots. In cases with the declined enzyme activity, there was performed a further search of pathogenic variants in the *GALC* gene. The concentration of glycosyl sphingosine (Lyso-GL1) biomarker was measured in 90 patients included in the study since 2016.

Results. The enzyme activity was decreased in all patients in comparison with the control group (0.33 ± 0.05 ; 2.95 ± 0.24 $\mu\text{mol/l/h}$, ($p < 0.001$; CI: 95%) in 9 patients. Also, we revealed an increased concentration of Lyso-GL1 biomarker in matched controls (12.50 ± 1.57 ng/ml; 1.8 ± 0.33 ng/ml, ($p < 0.005$; CI: 95%) in 5 patients. During molecular genetic testing of KD, three novel pathogenic variants of the *GALC* gene were revealed in 3 out of 9 patients: *c.265-2A>G*, *c.1036del* and *c.2037_2040del*.

Conclusion. The Lyso-GL1 concentration measurement can be used as an additional diagnostics method of KD. The high efficiency of the presented algorithm for the KD diagnostics in Russian children is presented.

Keywords: Krabbe disease; glucoceramide; glycosylsphingosine; galactosylcerebrosidase; lysosomal storage disease; tandem mass-spectrometry; sequencing; mutations of the *GALC* gene.

For citation: Pushkov A.A., Mazanova N.N., Kuzenkova L.M., Zhurkova N.V., Globa O.V., Alexeeva A.Yu., Migali A.V., Sukhozhenko A.V., Varichkina M.A., Chernyaev V.V., Asanov A.Yu., Savostyanov K.V., Fisenko A.P. Molecular diagnostics of the Krabbe disease in Russian children. *Nevrologicheskij Zhurnal imeni L.O. Badalyana (L.O. Badalyan Neurological Journal)*. 2020; 1(1): 21-28.

DOI: <https://doi.org/10.17816/2686-8997-2020-1-01-21-28>. (In Russian)

For correspondence: Alexander A. Pushkov, MD, Ph.D., leading researcher of the Laboratory of molecular genetics and medical genomics of the National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, 119991, Russian Federation.

E-mail: pushkovgenetika@gmail.com

Information about the authors:

Pushkov A.A., <http://orcid.org/0000-0001-6648-2063>
 Mazanova N.N., <http://orcid.org/0000-0002-3473-2897>
 Zhurkova N.V., <http://orcid.org/0000-0001-6614-6115>
 Alexeeva A.Y., <http://orcid.org/0000-0001-5309-6120>
 Kuzenkova L.M., <http://orcid.org/0000-0002-9562-3774>
 Migali A.V., <http://orcid.org/0000-0000-8709-0886>
 Varichkina M.A., <http://orcid.org/0000-0003-1718-8292>
 Sukhozhenko A.V., <http://orcid.org/0000-0003-1152-4929>
 Chernyaev V.V., <http://orcid.org/0000-0001-8046-9527>
 Asanov A.Yu., <http://orcid.org/0000-0003-0241-8999>
 Savostyanov K.V., <http://orcid.org/0000-0003-4885-4171>
 Fisenko A.P., <http://orcid.org/0000-0001-8586-7946>

Contribution:

Pushkov A.A. – concept and design of the study, collection and processing of material, writing the text.
 Mazanova N.N. – collection and processing of material, writing the text.
 Kuzenkova L.M. – collection and processing of material.
 Zhurkova N.V. – concept and design of the study, collection and processing of material, writing the text.
 Globa O.V. – collection and processing of material.
 Alexeeva A.Yu. – statistical processing.
 Migali A.V. – collection and processing of material.
 Sukhozhenko A.V. – collection and processing of material.
 Varichkina M.A. – collection and processing of material.
 Chernyaev V.V. – collection and processing of material, statistical processing.
 Asanov A.Yu. – collection and processing of material, editing.
 Savostyanov K.V. – concept and design of the study, collection and processing of material, writing the text, editing.
 Fisenko A.P. – collection and processing of material.

All authors are responsible for the integrity of all parts of the manuscript and approval of its final version.

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received: January 14, 2020

Accepted: January 23, 2020

Published: March 27, 2020

Введение

Болезнь Краббе (БК; глобоидно-клеточная лейкодистрофия) — нейродегенеративная лизосомная болезнь накопления, характеризующаяся снижением активности фермента галактозилцереброзидазы (ГЦ), что приводит к ухудшению деградации галактозилцереброзида и галактозилсфингозина, вызывая, в свою очередь, распад миелинового волокна с образованием глобоидных клеток [1].

Заболевание наследуется по аутосомно-рецессивному типу и вызвано мутациями в гене *GALC*, коди-

рующем ГЦ. Высокий уровень экспрессии гена *GALC* наблюдается в клетках центральной и периферической нервной системы, почек, кишечника, бронхов. Ген *GALC* картирован в хромосомной области 14q21–q31 и состоит из 17 экзонов общей протяженностью около 156 тыс. пар нуклеотидов [2]. Заболевание встречается с частотой примерно 1 случай на 100 тыс. живых новорожденных [3], при этом в некоторых этнических мусульманских группах частота гетерозиготных носителей мутаций в гене *GALC* может до-

стигать 1:166, что значительно увеличивает риск рождения детей с БК [4].

По возрасту начала и тяжести течения выделяют следующие клинические формы БК: ранняя инфантильная (до 90% случаев), поздняя инфантильная, ювенильная и взрослая формы [5]. Основные клинические проявления заболевания: частые срыгивания, прогрессирующая задержка психомоторного развития, гипертонус мышц конечностей, спастический тетрапарез, регресс ранее приобретенных навыков, атактический синдром, псевдобульбарные нарушения, судорожный синдром; со стороны органов зрения: нистагм, атрофия зрительных нервов, слепота; снижение слуха. При электронейромиографии выявляются признаки периферической полинейропатии, при магнитно-резонансной томографии головного мозга — поражение белого вещества головного мозга и диффузная церебральная атрофия [6]. К настоящему времени описано 262 различных патогенных варианта в гене *GALC* [7], при этом наиболее распространенными в Европе являются делеция 30 т.п.н. (*c.1161+6532_polyA+9kdel*), включающая экзоны 11–17 гена *GALC*, а также две миссенс-мутации *c.1586C>T (p.T529M)* и *c.1700A>C (p.Y567S)*, на долю которых приходится до 60% инфантильной формы БК [8, 9]. Единственным возможным лечением БК является трансплантация гематопоэтических клеток, которую необходимо проводить до появления симптомов болезни, что возможно лишь в случае ранней диагностики посредством неонатального или селективного скрининга в младенческом возрасте. Кроме того, в последние годы активно разрабатываются новые методы генотерапии БК, в том числе с применением технологии CRISPR/Cas9 [10].

Первый пилотный проект неонатального скрининга на БК был проведен в 2006 г. в США [11]. Согласно опубликованным недавно результатам программы, частота БК составила 1:380 000 обследованных [12]. Согласно данным литературы, клинический полиморфизм БК подтверждает тот факт, что даже внутри одной семьи больные сибсы могут иметь различные формы заболевания, при этом некоторые исследователи связывают прогноз тяжести клинических проявлений и возраст начала заболевания с типом мутаций в гене *GALC* [4, 7]. Однако в одной из последних работ, анализирующей биохимические, молекулярно-генетические и нейродиагностические параметры 122 больных с БК из мирового регистра, не выявлено четких корреляций с фенотипом заболевания [13]. Отсутствие таких корреляций в некоторых случаях может затруднять прогноз развития и исхода заболевания и подчеркивает значимость получения новых данных об особенностях генотипа, в том числе новых мутаций, уровней активности ГЦ и других специфичных биомаркеров у пациентов с БК из различных популяционных групп.

Цель работы — исследовать клинические, географические, биохимические и молекулярно-генетические характеристики 9 российских больных с БК.

Материалы и методы

В кросс-секционное исследование были включены 190 пациентов с подозрением на БК, обследованных в лаборатории молекулярной генетики и медицинской геномики ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» в 2012–2019 гг. Критериям включения являлось наличие клинической картины нейродегенеративного заболевания. Информированное согласие на проведение биохимических и молекулярно-генетических исследований было получено от законных представителей пациентов. Возраст пациентов на момент забора материала составил от 1 мес до 3 лет. У всех пациентов методом тандемной масс-спектрометрии определяли активность ГЦ. Концентрацию биомаркера гликозилсфингозина (лизо-Гл1) как смеси гексазилсфингозинов измеряли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии у 90 пациентов, включенных в программу скрининга с 2016 г.

В качестве биологического материала для проведения исследования были использованы сухие капли крови, нанесенные на диски фильтровальной бумаги Whatman 903. До и после проведения исследования образцы хранились в холодильнике при +4°C.

Активность фермента ГЦ определяли с использованием субстрата и внутреннего стандарта производства компании «CDC». После проведения экстракции, ферментации и очистки образцы вводили в систему жидкостного хроматографа «Thermo Ultimate 3000» («Thermo Fisher Scientific Inc.»). Далее проводился анализ проточно-инжекционным методом (без хроматографического разделения в колонке) на квадрупольном тандемном масс-спектрометре «Maxis Impact» («Bruker Corporation») с положительной ионизацией в электроспрее. Время, затрачиваемое на анализ одной пробы, составляло 150 с. Концентрацию целевого анализа рассчитывали с помощью программного обеспечения «Bruker Data Analysis 4.1» путем автоматического соотношения полученных в ходе анализа показателей с концентрациями соответствующего рабочего стандарта (рис. 1).

В качестве контрольной группы для определения референсных интервалов и значений отрезной точки выступали 100 условно здоровых детей (50 девочек и 50 мальчиков) в возрасте 4–42 мес (средний возраст 26 мес). Медиана активности ГЦ в контрольной группе составила 2,9 мкмоль/л/ч. Отрезная точка была выбрана на уровне 2,5 перцентилля и составила 0,89 мкмоль/л/ч. Та же группа была использована для определения референсных интервалов лизо-Гл1. Медиана концентрации составила 1,65 нг/мл, отрезная точка была определена на уровне 97,5 перцентилля и составила 9,80 нг/мл.

Образцы со сниженной активностью ГЦ далее подвергали молекулярно-генетической диагностике.

Концентрацию лизо-Гл1 определяли в пятнах крови, высушенных на фильтровальной бумаге, ме-

тодом ВЭЖХ. После проведения стадии экстракции образцы разделяли на хроматографе высокого давления «Agilent infinity 1260» («Agilent») и анализировали на квадрупольном тандемном масс-спектрометре высокого разрешения «Bruker Maxis Impact» («Bruker»). Масс-спектрометрическое детектирование проводили в тандемном режиме регистрации положительных ионов с использованием электрораспылительной ионизации. Масс-анализатор работал в режиме детектирования ионов-продуктов в диапазоне 100–800 m/z с точностью определения масс не хуже 5 ppm и разрешением не менее 20 000 (полная ширина на уровне половинной амплитуды (FWHM)). Полученные дан-

ные обрабатывали с использованием пакета программ «Bruker Data Analysis 4.2».

Аналитическая система была успешно откалибрована в диапазоне концентраций лизо-Гл1 1–50 нг/мл. Коэффициент корреляции R калибровочной характеристики составил не менее 0,9950 (рис. 2, 3).

Геномную ДНК из пятен крови выделяли методом фенол-хлороформной экстракции. Поиск протяженной делеции экзонов 11–17 (30kb del) проводили с использованием метода аллель-специфичной ПЦП согласно протокола, предложенного ранее [14]. В случае отсутствия гомозиготной делеции целевые области гена *GALC*, содержащие все кодиру-

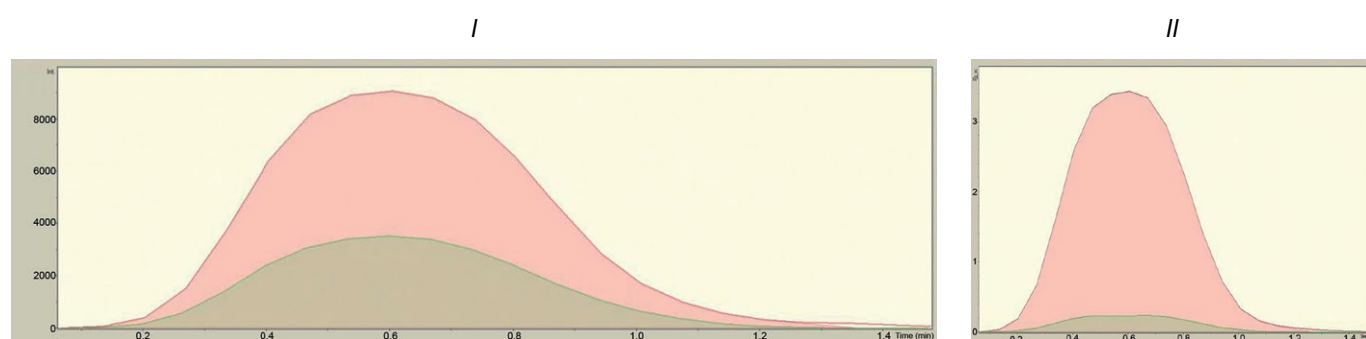


Рис. 1. Хроматограммы внутреннего стандарта ГЦ и аналитов у здорового ребенка (I) и ребенка с БК (II).

По оси абсцисс — время, мин; по оси ординат — интенсивность, мкмоль/л/ч.

Fig. 1. Chromatograms of the internal standard of galactosylcerebrosidase and analytes in a healthy child (I) and a child with KD (II) in $\mu\text{mol/liter/hour}$ (on the ordinate axis: intensity, on the abscissa axis: time in minutes).

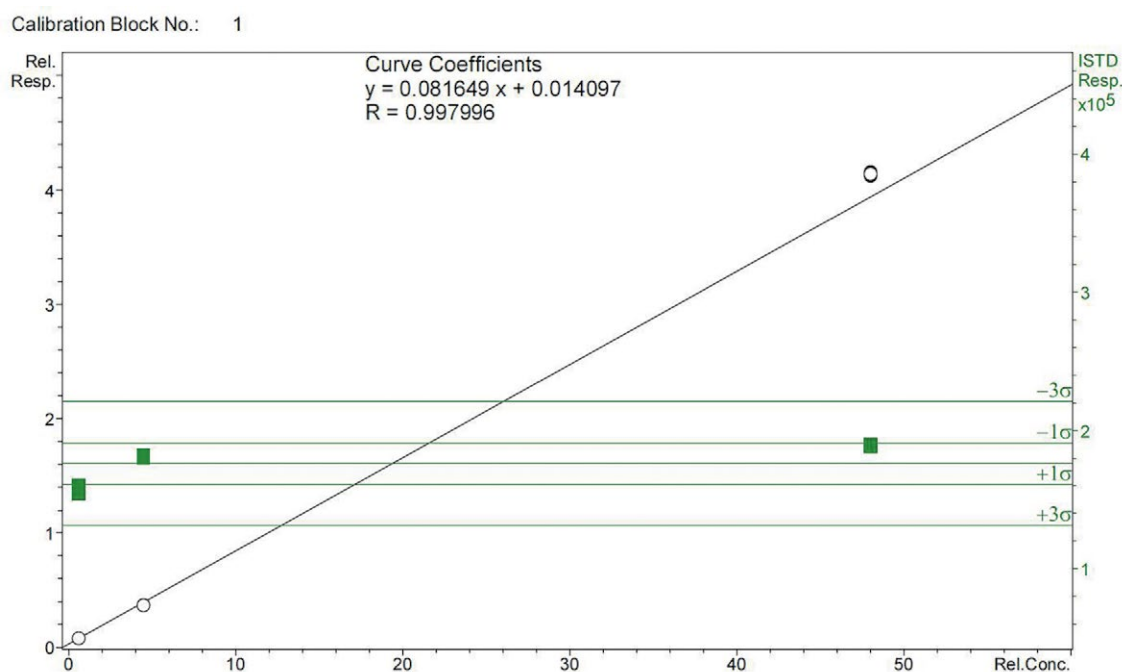


Рис. 2. Калибровочный график, уравнение калибровочной характеристики, значение коэффициента корреляции.

Fig. 2. The calibration graph, the equation of the calibration characteristic, the value of the correlation coefficient.

ющие экзоны с прилегающими интронными областями, амплифицировали на термоциклере «Bio-Rad T100» в 20 мкл реакционной смеси «AmpliTag Gold® 360 Master Mix» («ThermoFisher Scientific»). Условия ПЦР: 95°C/3 мин — 1-й цикл; 95°C/10 с, 60°C/30 с; 72°C/55 с — 34 цикла, 72°C/5 мин — последний цикл. Продукты реакции анализировали в агарозном геле, после чего амплификат исследовали методом двунаправленного автоматического секвенирования с использованием набора «BigDye Terminator Cycle Sequencing v3.1» («ThermoFisher Scientific») на автоматическом биологическом анализаторе ДНК «ABI 3500 XL» («ThermoFisher Scientific»). Выявленные нуклеотидные последовательности сравнивали с референсной последовательностью RefSeqGen NM (*GALC*) из базы данных Национального центра биотехнологической информации (США).

Размер выборки предварительно не рассчитывали. Анализ данных выполнен с применением пакета статистических программ SPSS Statistics 20 («SPSS: An IBM Company»). Для сравнения показателей в группах применяли *U*-критерий Манна–Уитни.

Результаты

Проведенный нами анализ показал, что клинические проявления заболевания наблюдались у пациентов уже в первые 2 мес жизни ($1,75 \pm 0,5$ мес) в виде частых срыгиваний и повышенной возбудимости. Да-

лее заболевание быстро прогрессировало, развивался судорожный синдром, псевдобульбарный синдром, спастический тетрапарез, тяжелая белково-энергетическая недостаточность, происходила утрата ранее приобретенных навыков (табл. 1). При проведении МРТ головного мозга у всех пациентов наблюдалась картина, характерная для БК. Возраст постановки диагноза составил $8,75 \pm 1,5$ мес.

В результате проведенного биохимического исследования 190 биологических образцов у 9 пациентов было выявлено снижение активности ГЦ. У всех 9 пациентов активность фермента лежала ниже отрезной точки, составляя $0,32 \pm 0,13$ мкмоль/л/ч и не перекрывалась с областью значений активности ГЦ в контрольной группе. Значение отрезной точки при этом соответствовало значениям отрезных точек, определенным S. Elliott и соавт. [15]. Значение концентрации лизо-Гл1 удалось измерить только у 5 из 9 диагностированных пациентов. У всех детей значения лизо-Гл1 были выше значения отрезной точки и составили $12,50 \pm 1,57$ нг/мл.

Случаи заболевания, выявленные в нашем исследовании, распределились равномерно (по 11%) по следующим регионам: Республика Дагестан, Ставропольский край, Самарская, Орловская и Оренбургская области, город Москва. Наибольшее число пациентов (3 ребенка; 34%) выявлено в Чеченской Республике.

В результате молекулярно-генетического исследования у 6 (67%) пациентов выявлена протяженная

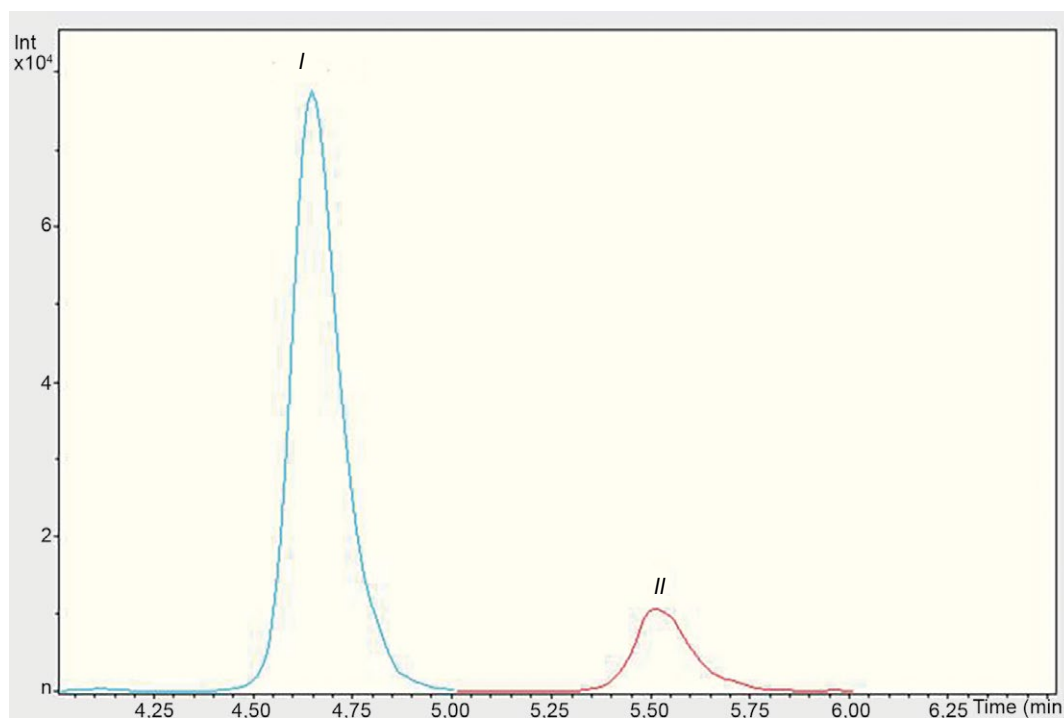


Рис. 3. Хроматограмма рабочего стандарта (I) и лизо-Гл1 с концентрацией 50 нг/мл (II).

По оси абсцисс — время, мин; по оси ординат — интенсивность сигнала ($\times 10^4$).

Fig. 3. Chromatogram of the working standard (I) and glycosylsphingosine at a concentration of 50 ng/ml (II). On the ordinate axis: intensity ($\times 10^4$), on the abscissa axis: time in minutes.

Таблица 1. Клинико-anamnestические характеристики обследованных пациентов с БК на момент постановки диагноза
Table 1. Clinical and anamnestic characteristics of the examined patients with KD at the time of diagnosis

Показатель Index	Пациент Patient								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Год рождения Year of birth	2013	2013	2014	2015	2015	2017	2018	2018	2019
Семейный анамнез Family history	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Возраст манифестации заболевания, мес Age of manifestation of the disease, months	-	3	2	2	3	3	3	2	1
Постановка диагноза, мес Making a diagnosis, months	9	13	5	11	11	12	8	4	1
Срыгивание Regurgitation	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Судорожный синдром Convulsive syndrome	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Задержка психомоторного развития Retardation of the psychomotor development	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Регресс навыков Regression of skills	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Гипертонус мышц конечностей/ спастический тетрапарез Hypertonicity of the muscles of limbs/spastic tetraparesis	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Псевдобульбарный бульбарный синдром Pseudobulbar/bulbar syndrome	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Атрофия зрительного нерва Optic atrophy	+	+	+	+	+	-	-	-	-

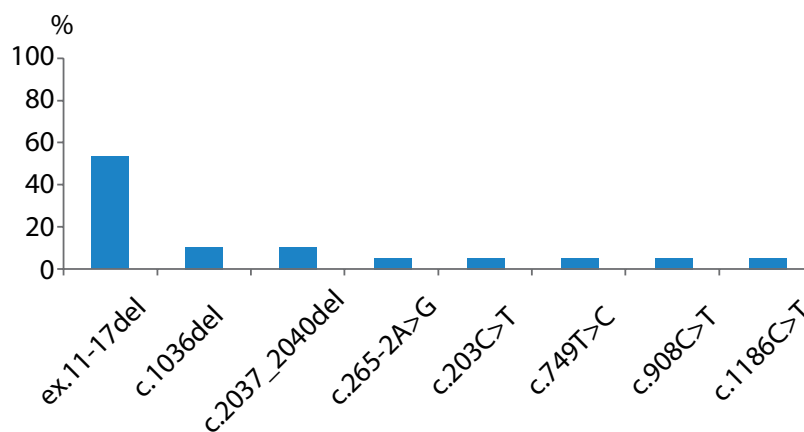


Рис. 4. Относительные частоты (%) и спектр мутаций гена *GALC*, выявленные в результате исследования.

Fig. 4. Relative frequencies (%) and spectrum of mutations of the *GALC* gene identified as a result of the study.

делеция *ex.11-17del*, причем у 3 пациентов — в гомозиготном состоянии. Кроме того, среди обнаруженных вариантов найдены 4 описанные ранее миссенс-мутации: *c.203C>T*, *c.749T>C*, *c.908C>T* и *c.1186C>T*, один новый патогенный вариант, затрагивающий канонический сайт сплайсинга *c.265-2A>G* (PVS1, PS3, PM2, PM3 PP4), а также две новые патогенные делеции, сдвигающие рамку считывания: *c.1036del* (PVS1, PS3, PM2, PP4) и *c.2037_2040del* (PVS1, PS3, PM2, PP4). Все неописанные варианты являются патогенными согласно критериям ACMG [16]. В общей сложности

в нашем исследовании было обнаружено 8 различных нуклеотидных вариантов в гене *GALC* (рис. 4). Лабораторные показатели и данные молекулярно-генетического исследования приведены в табл. 2.

Обсуждение

С помощью биохимических и молекулярно-генетических методов лабораторный диагноз БК удалось установить у 9 пациентов. Примененный нами алгоритм диагностики продемонстрировал свою высокую эффективность, выявив, что все 9 пациентов, показав-

Таблица 2. Лабораторные показатели и данные молекулярно-генетического исследования российских детей с БК

Table 1. Laboratory indices and data of the molecular genetic investigation of Russian children with BK

№ п/п	Дата рождения Birth date	Активность фермента, мкмоль/л/ч The activity of the enzyme, μmol/liter/h	Концентрация лизо-Гл1, нг/мл Lyso-G11 concentration, ng/ml	Варианты в гене <i>GALC</i> , выявленные в результате исследования <i>GALC</i> gene variants identified as a result of the study			
				нуклеотидный (аминокислотный) вариант 1 nucleotide (amino acid) variant 1	первое описание first description	нуклеотидный (аминокислотный) вариант 2 nucleotide (amino acid) variant 2	первое описание first description
1.	2013	0.52	н/д	<i>ex.11-17del</i>	[Luzi, 1995]	<i>c.749T>C (p.I250T)</i>	[De Gasperi, 1996]
2.	2013	0.35	н/д	<i>c.2037_2040del (p.F679Lfs*9)</i>	Данное исследование This study	<i>c.2037_2040del (p.F679Lfs*9)</i>	Данное исследование This study
3.	2014	0.21	н/д	<i>ex.11-17del</i>	[Luzi, 1995]	<i>ex.11-17del</i>	[Luzi, 1995]
4.	2015	0.23	14.65	<i>ex.11-17del</i>	[Luzi, 1995]	<i>ex.11-17del</i>	[Luzi, 1995]
5.	2015	0.46	н/д	<i>c.265-2A>G</i>	Данное исследование This study	<i>c.908C>T (p.S303F)</i>	[Wenger, 1997]
6.	2017	0.32	11.55	<i>c.1036del (p.H346Ifs*13)</i>	Данное исследование This study	<i>c.1036del (p.H346Ifs*13)</i>	Данное исследование This study
7.	2018	0.12	13.27	<i>ex.11-17del</i>	[Luzi, 1995]	<i>ex.11-17del</i>	[Luzi, 1995]
8.	2018	0.18	12.50	<i>ex.11-17del</i>	[Luzi, 1995]	<i>c.1186C>T (p.R396W)</i>	[Wegner, 1997]
9.	2019	0.34	10.55	<i>c.203C>T (p.S68F)</i>	[Fu, 1999]	<i>ex.11-17del</i>	[Luzi, 1995]

ших снижение активности ГЦ ниже отрезной точки, имели патогенные варианты в гене *GALC*.

Протяженная делеция *ex.11-17del* выявлена у 6 (67%) пациентов, что соответствовало данным о наибольшей распространенности данного варианта в европейской популяции [17]. Однако при этом два других наиболее частых для европейской популяции варианта гена *GALC* *c.1586C>T* и *c.1700A>C* в нашем исследовании не были обнаружены. Среди 8 различных выявленных нами вариантов в гене *GALC* 3 (38%) варианта не были описаны к настоящему моменту в базе данных HGMD Professional. Такой высокий процент, несмотря на незначительную когорту выявленных больных, может указывать, с одной стороны, на генетическую гетерогенность, а с другой стороны — на недообследованность пациентов с БК, проживающих на территории России.

Особого внимания заслуживает тот факт, что мутации гена *GALC* в гомозиготном состоянии встретились у 5 (56%) из 9 выявленных пациентов, что отчасти может быть связано с высоким процентом близкородственных браков, а также с накоплением определенных мутаций в отдельных популяционных группах. Это подтверждает необходимость обязательного медико-генетического консультирования при проведении исследования на БК, а также при планировании беременности в семьях с отягощенным анамнезом.

В результате нашей работы нам не удалось выявить генотип-фенотипических корреляций, при этом анализ активности ГЦ показал, что наиболее низкие

значения активности демонстрировали гомозиготные носители делеции *ex.11-17del*. Однако для получения статистически достоверных данных, подтверждающих эту гипотезу, необходимо продолжить исследование на более репрезентативной выборке.

Измерение концентрации лизо-Гл1, использованное в нашей работе для биохимической диагностики пациентов с подозрением на БК, имеет важную научно-практическую значимость. Этот биомаркер может быть использован в скрининговых исследованиях в качестве дополнительного анализатора БК, тогда как для рекомендации этого биомаркера в качестве первичного анализатора для диагностики БК, как в случае болезни Гоше [18], требуются дальнейшие исследования с включением большего числа пациентов.

В связи с ранней манифестацией и быстрым прогрессированием заболевания у всех выявленных нами 9 пациентов, своевременная диагностика является важной как для установления точного диагноза БК, так и для профилактики повторных случаев БК в отягощенных семьях.

Заключение

БК является тяжелым инвалидизирующим нейродегенеративным заболеванием, проявляющимся у детей с первых месяцев жизни. Единственным возможным инструментом для выявления этого заболевания на ранних этапах является энзимодиагностика в рамках селективного скрининга, позволяющая диагностировать заболевание на ранних сроках, в доклинической стадии.

Примененный в нашей работе пошаговый алгоритм селективного скрининга с использованием хромато-масс-спектрометрического анализа с последующим подтверждением молекулярно-генетическими методами исследования показал высокую эффективность и может быть предложен для внедрения в широкую лабораторную практику для диагностики БК в России. Кроме того, выявленные нами особенности российских детей с БК открывают большие перспективы для дальнейших, более масштабных исследований. Ранняя диагностика в сочетании с новейшими, активно разрабатываемыми в настоящее время методами генной и клеточной терапии могут предотвратить развитие тяжёлой клинической симптоматики и существенно улучшить качество жизни пациентов с БК.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Suzuki K., Suzuki Y. Globoid cell leukodystrophy (Krabbe's disease): deficiency of galactocerebroside beta-galactosidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1970; 66(2): 302-9. DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.66.2.302>
2. Wenger D.A., Rafi M.A., Luzi P. Molecular genetics of Krabbe disease (globoid cell leukodystrophy): Diagnostic and clinical implications. *Hum. Mutat.* 1997; 10(4): 268-79. DOI: [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(1997\)10:4<268::AID-HUMU2>3.0.CO;2-D](http://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(1997)10:4<268::AID-HUMU2>3.0.CO;2-D)
3. Ткачева Н.В., Сопрунова И.В., Белопасов В.В., Казьмирчук О.Н., Цохонва Ж.М. Лейкодистрофия Краббе (Наблюдение из практики). *Астраханский медицинский журнал*. 2014; 9(2): 141-4. Tkacheva N.V., Soprunova I.V., Belopasov V.V. Kaz'mirchuk O.N., Tsotsonava Zh.M. Krabbe disease (Case report). *Astrakhanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2014; 9(2): 141-4. (in Russian)
4. Pannuzzo G., Graziano A.C.E., Avola R., Drago F., Cardile V. Screening for Krabbe disease: the first two years' experience. *Acta Neurol. Scand.* 2019; 140(5): 359-65. DOI: <http://doi.org/10.1111/ane.13153>
5. Nashabat M., Al-Khenaizan S., Alfadhel M. Report of a case that expands the phenotype of infantile Krabbe disease. *Am. J. Case Rep.* 2019; 20: 643-6. DOI: <http://doi.org/10.12659/AJCR.914275>
6. Bascou N.A., Marcos M.C., Beltran Quintero M.L., Roosen-Marcos M.C., Cladis F.P., Poe M.D., et al. General anesthesia safety in progressive leukodystrophies: A retrospective study of patients with Krabbe disease and metachromatic leukodystrophy. *Paediatr. Anaesth.* 2019; 29(10): 1053-9. DOI: <http://doi.org/10.1111/pan.13714>
7. Human Gene Mutation Database. HGMD® Professional 2019.3. Available at: <https://portal.biobase-international.com>
8. Breiden B., Sandhoff K. Lysosomal glycosphingolipid storage diseases. *Annu. Rev. Biochem.* 2019; 88: 461-85. DOI: <http://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-111518>
9. Wenger D.A., Rafi M.A., Luzi P., Datto J., Costantino-Ceccarini E. Krabbe disease: genetic aspects and progress toward therapy. *Mol. Genet. Metab.* 2019; 70(1): 1-9. DOI: <http://doi.org/10.1006/mgme.2000.2990>
10. Dever D.P., Scharenberg S.G., Camarena J., Kildebeck E.J., Clark J.T., Martin R.M., et al. CRISPR/Cas9 genome engineering in engraftable human brain-derived neural stem cells. *iScience*. 2019; 15: 524-35. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.isci.2019.04.036>
11. Duffner P.K., Caggana M., Orsini J.J., Wenger D.A., Patterson M.C., Crosley C.J., et al. Newborn screening for Krabbe disease: the New York State model. *Pediatr. Neurol.* 2009; 40(4): 245-52. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2008.11.010>
12. Orsini J.J., Kay D.M., Saavedra-Matiz C.A., Wenger D.A., Duffner P.K., Erbe R.W., et al. Newborn screening for Krabbe disease in New York State: the first eight years' experience. *Genet. Med.* 2016; 18(3): 239-48. DOI: <http://doi.org/10.1038/gim.2015.211>
13. Madsen A.M.H., Wibrand F., Lund A.M., Ek J., Dunø M., Østergaard E. Genotype and phenotype classification of 29 patients affected by Krabbe disease. *JMD Rep.* 2019; 46(1): 35-45. DOI: <http://doi.org/10.1002/jmd2.12007>
14. Luzi P., Rafi M.A., Wenger D.A. Characterization of the large deletion in the GALC gene found in patients with Krabbe disease. *Hum. Mol. Genet.* 1995; 4(12): 2335-8. DOI: <http://doi.org/10.1093/hmg/4.12.2335>
15. Fu L., Inui K., Nishigaki T., Tatsumi N., Tsukamoto H., Kokubu C., et al. Molecular heterogeneity of Krabbe disease. *J. Inher. Metab. Dis.* 1999 Apr; 22(2): 155-62.
16. De Gasperi R., Gama Sosa M.A., Sartorato E.L., Battistini S., MacFarlane H., Gusella J.F., et al. Molecular heterogeneity of late-onset forms of globoid-cell leukodystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 1996 Dec; 59(6): 1233-42.
17. Elliott S., Buroker N., Cournoyer J.J., Potier A.M., Trometer J.D., Elbin C., et al. Pilot study of newborn screening for six lysosomal storage diseases using Tandem Mass Spectrometry. *Mol. Genet. Metab.* 2016; 118(4): 304-9. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.ymgme.2016.05.015>
18. Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б., Коновалов Ф.А., Масленников А.Б., Степанов В.А. и др. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018. версия 2). *Медицинская генетика*. 2019; 18(2): 3-23. DOI: <http://doi.org/10.25557/2073-7998.2019.02.3-23>
19. Ryzhkova O.P., Kardymon O.L., Prokhorchuk E.B., Kononov F.A., Maslennikov A.B., Stepanov V.A., et al. Guidelines for the interpretation of human DNA sequence data obtained by method of massive parallel sequencing (MPS) (revision of 2018. 2nd version). *Meditsinskaya genetika*. 2019; 18(2): 3-23. DOI: <http://doi.org/10.25557/2073-7998.2019.02.3-23> (in Russian)
19. Wenger D.A. Krabbe disease. In: Adam M.P., Ardinger H.H., Pagon R.A., Wallace S.E., Bean L.J.H., Stephens K., et al. *GeneReviews®*. Seattle, WA: University of Washington; 1993.
20. Savostyanov K.V., Pushkov A.A., Murav'ova L.V., Movsisyan G.B., Rykunova A.I., Ponomarev R.V., et al. Glucosylfingosine (Lyso-GL1) may be the primary biomarker for screening Gaucher disease in Russian patients. *Mol. Genet. Metab.* 2019; 126(2): S130. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.12.334>