

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
ИМЕНИ В.А. АЛМАЗОВА» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

**ЧУРЮМОВА**

**Юлия Александровна**

**ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ В  
НЕОНАТАЛЬНОМ СКРИНИНГЕ МОНОГЕННЫХ НАСЛЕДСТВЕННЫХ  
БОЛЕЗНЕЙ ОБМЕНА**

**3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика**

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

**Научный руководитель:**

**доктор медицинских наук, профессор,**

**заслуженный деятель науки РФ Т.В. Вавилова**

Санкт-Петербург – 2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Глава 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ДИАГНОСТИКЕ НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ ОБМЕНА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	12
1.1 Эпидемиология и патогенез наследственных болезней обмена.....	12
1.2. Диагностика наследственных болезней обмена.....	16
1.3. Неонатальный скрининг наследственных болезней обмена.....	19
1.4. Неонатальный скрининг как часть государственной системы здравоохранения.....	20
1.4.1. Муковисцидоз.....	25
1.4.2. Фенилкетонурия.....	28
1.4.3. Галактоземия.....	31
1.4.4. Методы лабораторной диагностики в неонатальном скрининге РФ.....	35
1.5. Технология высокопроизводительного секвенирования NGS.....	38
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	41
2.1 Характеристика групп обследуемых.....	41
2.2. Исследуемые параметры.....	41
2.2.1 Биохимические методы исследования.....	44
2.2.2 Молекулярно-биологические методы.....	45
2.3. Статистические методы.....	46
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	50
3.1 Оценка диагностической информативности лабораторных тестов, используемых для скрининга муковисцидоза в рамках стандартного алгоритма.....	50
3.2 Оценка диагностической информативности лабораторных тестов, используемых для скрининга фенилкетонурии в рамках стандартного алгоритма.....	53
3.3 Оценка диагностической информативности лабораторных тестов, используемых для скрининга галактоземии в рамках стандартного алгоритма.....	57

3.4. Определение пороговых значений показателей иммунореактивного трипсиногена (ИРТ1, ИРТ2) в точках принятия решений на основе данных неонатального скрининга на муковисцидоз.....	62
3.5 Разработка алгоритма неонатального скрининга с включением NGS секвенирования в качестве теста второго уровня.....	64
3.6. Сравнение эффективности существующего алгоритма неонатального скрининга с предложенным.....	66
3.7. Спектр выявленных генетических вариантов, обуславливающих развитие “мягких” форм моногенных наследственных заболеваний.....	76
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	83
ВЫВОДЫ.....	86
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	87
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	88
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	89
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	90

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы исследования**

Наследственные болезни обмена (НБО) представляют собой разнообразный класс генетических расстройств, при которых специфические ферментативные дефекты препятствуют нормальному метаболизму экзогенных или эндогенных биохимических веществ [76, 137]. В настоящее время известно более 500 различных НБО, причем приблизительно 25% из них проявляются в неонатальном периоде [121]. Данная группа заболеваний является наиболее распространенной причиной смерти на первом году жизни, приводя к смертельным исходам более трех миллионов детей в возрасте до 5 лет в мире каждый год [4, 53]. Кроме того, аналогичное число детей с наследственной патологией выживает, имея серьезные осложнения, приводящие к инвалидности [120]. Диагностика данных заболеваний, как правило, затруднена по нескольким причинам [13, 105]. Во-первых, клинические проявления различных форм НБО в большинстве своем не специфичны и схожи с таковыми при других заболеваниях, связанных с поражениями различных органов и их комбинаций. Во-вторых, патогенез одного и того же заболевания может обуславливать совершенно разные фенотипы в зависимости от возраста манифестации. В-третьих, диагностика определенных классов заболеваний требует назначения специфических лабораторных тестов. Поздняя диагностика этих метаболических нарушений приводит к необратимой умственной отсталости, неврологическим нарушениям, инвалидности и даже к смерти [15]. В России вклад наследственных болезней обмена в детскую заболеваемость и смертность также велик, по расчетным данным ежегодно рождается от 35000 до 75000 больных детей [23]. Для некоторых НБО установлена средняя частота: фенилкетонурия – 1:6971 [7], муковисцидоз – 1:10296 [19], адреногенитальный синдром – 1:9563 [16]; врожденный гипотиреоз – 1:3689 [9], галактоземия – 1:20149 [3].

## Степень разработанности темы

Во многих странах с целью вторичной профилактики, направленной на раннее выявление наследственных болезней обмена, национальные программы здравоохранения предусматривают проведение массового скрининга новорожденных [22, 28, 126]. В России неонатальный скрининг с 2006 г. в рамках приоритетного проекта “Здоровье” был расширен до 5 наследственных заболеваний. Наряду с тестируемыми ранее фенилкетонурией и врожденным гипотиреозом в обследование включены муковисцидоз, галактоземия, и адреногенитальный синдром [25]. С 1 января 2023 года в дополнение к существующему скринингу проводится исследование методом tandemной масс-спектрометрии биохимических маркеров 36 заболеваний, для которых разработаны и успешно применяются схемы лечения, основанные на диетотерапии [26]. При этом, несмотря на высокие показатели чувствительности и специфичности определяемых биомаркеров, биохимический скрининг характеризуется низкими значениями положительной прогностической ценности, что обуславливает высокий процент ложноположительных результатов [11, 141, 150]. Помимо серьезных экономических затрат, ложноположительные результаты имеют существенные негативные последствия в виде тяжелого психологического стресса родителей [139]. Эти факторы указывают на необходимость проведения подтверждающих, более специфичных тестов при получении положительного результата скрининга [12]. В настоящее время в России не регламентированы единые алгоритмы проведения подтверждающих лабораторных тестов в рамках программ неонатального скрининга [25]. Существующие клинические рекомендации для отдельных заболеваний направлены на диагностику при обследовании конкретного пациента и не могут быть использованы в программах массового скрининга. Отсутствие четких рекомендаций по проведению подтверждающих тестов и маршрутизации пациентов с положительными результатами неонатального скрининга обуславливает “диагностическую одиссею”, затягивающую постановку диагноза и откладывающую лечение, а также повышает тревожность родителей таких детей.

Почти все заболевания, включенные в программу неонатального скрининга, являются моногенными и гены, ответственные за их развитие, хорошо изучены. В сочетании с существенным снижением стоимости секвенирования генома это создает благоприятные предпосылки для применения генетических тестов в структуре скрининга. Технология высокопроизводительного секвенирования, благодаря возможности одновременно быстро и точно определять последовательность групп генов в нескольких десятках образцов, позволит существенно повысить эффективность скрининговых программ. В связи с этим, в мире ведутся активные обсуждения возможности использования геномного секвенирования для популяционного скрининга, в том числе и неонатального [78, 109]. Однако прежде, чем секвенирование генома будет реализовано в программах массового обследования новорожденных, необходимо научно обосновать его клиническую пользу и экономическую эффективность, а также определить способность выявлять патогенные и доброкачественные варианты исследуемых генов [8, 20]. Кроме того, необходимо рассмотреть этические вопросы, касающиеся получения случайных находок для пациентов и их семей, а также вопросы надлежащего хранения и использования геномных данных [10,14, 34, 47, 142].

Высокий процент ложноположительных результатов, обусловленных низкой распространенностью каждого заболевания в популяции, сложности, возникающие при интерпретации неоднозначных результатов биохимического скрининга, а также отсутствие протоколов подтверждающей диагностики, создают необходимость оптимизации алгоритмов неонатального скрининга наследственных заболеваний. С учетом этого были сформулированы цель и задачи настоящего исследования.

### **Цель исследования**

Разработать и оценить эффективность алгоритма неонатального скрининга моногенных наследственных болезней обмена: муковисцидоза, фенилкетонурии и галактоземии с использованием технологии высокопроизводительного секвенирования (NGS) в популяции новорожденных в г. Санкт-Петербург.

### **Задачи исследования**

1. Оценить диагностическую информативность лабораторных тестов, используемых для неонатального скрининга на муковисцидоз, фенилкетонурию и галактоземию в рамках использования стандартного алгоритма.
2. Определить оптимальные пороговые значения показателей иммунореактивного трипсиногена (ИРТ1, ИРТ2) в точках принятия решений на основе ретроспективных данных неонатального скрининга на муковисцидоз;
3. Разработать алгоритм неонатального скрининга с включением NGS секвенирования в качестве теста второго уровня и сравнить его эффективность с существующим.
4. Определить значение NGS секвенирования для выявления генетических вариантов, обуславливающих развитие “мягких” форм моногенных наследственных заболеваний.

### **Научная новизна исследования**

Впервые в РФ на большом клиническом материале (196217 новорожденных) произведена оценка эффективности программы неонатального скрининга на муковисцидоз, фенилкетонурию и галактоземию, проводимых по схеме двукратного определения соответствующих биохимических маркеров (ИРТ1/ ИРТ2, ФА1/ФА2, ГАО1/ГАО2). Рассчитаны критерии информативности протоколов скрининга: чувствительность, специфичность, положительная прогностическая ценность, отрицательная прогностическая ценность, положительное и отрицательное отношение правдоподобия.

Впервые в рамках скрининга проведено исследование мутаций в генах CFTR, PAH и GALT методом высокопроизводительного секвенирования. Проведен анализ частот и спектра отдельных мутаций указанных генов в популяции Северо-Западного региона РФ.

Проведен сравнительный анализ алгоритмов диагностики муковисцидоза, фенилкетонурии и галактоземии с применением только биохимических и комплекса биохимических/молекулярно-генетических методов скрининга новорожденных.

Научно обоснована необходимость проведения подтверждающей молекулярно-генетической диагностики исследуемых моногенных заболеваний на третьем этапе скрининга новорожденных с целью ранней диагностики и своевременного начала лечебно-профилактических мероприятий. Предложен и апробирован новый методологический подход для проведения неонатального скрининга наследственных болезней обмена с применением NGS секвенирования.

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

Предложен научно обоснованный алгоритм диагностики с применением методов расширенного геномного тестирования, позволяющий верифицировать диагноз наследственного заболевания после проведения скрининговых исследований.

Определена аналитическая точность и клиническая польза рутинного применения метода секвенирования в программе массового скрининга новорожденных.

Показана возможность выявления больных муковисцидозом с генотипами, включающими редкие мутации, на основе анализа более 600 мутаций в гене CFTR методом NGS.

Продемонстрированы возможности NGS для выявления больных с гиперфенилаланинемией, обусловленной «мягким» генотипом, не требующих назначения лечебного питания.

Показано влияние гетерозиготного носительства мутантных аллелей гена GALT, а также аллелей, характерных для биохимической формы галактоземии Дуарте, на уровень общей галактозы в крови у новорожденных.

Представлены доказательства возможности идентификации гетерозиготных носителей патологических мутаций, не проявляющихся клинически, но дающих высокий риск развития заболевания в последующих поколениях, позволяет повысить эффективность медико-генетического консультирования.

### **Методология и методы исследования**

Для реализации поставленной цели была проработана отечественная и зарубежная литература, проведено комплексное ретроспективно-перспективное



исследование, в котором использованы биохимические и молекулярно-генетические методы исследования образцов крови пациентов. Обработка полученных данных производилась с использованием современных методов и программ статистической обработки, в том числе применяемым к big data.

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

1. Несмотря на высокую чувствительность и специфичность лабораторных биохимических тестов, в связи с низкой распространенностью заболеваний муковисцидоза, фенилкетонурии и галактоземии в популяции и низкими показателями прогностической ценности положительных результатов, высока вероятность получения ложноположительных результатов при использовании стандартного алгоритма.

2. Первый этап биохимического скрининга с использованием измерения концентрации иммунореактивного трипсиногена показывает удовлетворительные диагностические характеристики теста и соответствие уровня порогового значения, заявленному по стандартному протоколу. В случае нарушения контрольных сроков забора крови для проведения ретестирования ИРТ, диагностическая ценность исследования теряется.

3. Диагностическая эффективность алгоритма неонатального скрининга моногенных наследственных болезней обмена максимальна при комплексном использовании биохимических методов и таргетного высокопроизводительного секвенирования NGS за счет достижения наибольшей прогностической ценности положительного результата.

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

Достоверность и обоснованность полученных результатов научной работы обеспечена детальным теоретическим анализом проблемы, репрезентативным объемом выборки обследованных пациентов, достаточным количеством проведенных исследований и адекватным статистическим анализом полученных данных. Сформированные и обследованные группы больных сопоставимы по полу, возрасту, репрезентативны по количеству и могли использоваться для решения поставленных задач.

Материалы диссертационного исследования были представлены на Международной научной конференции Научного Парка СПбГУ «Трансляционная биомедицина: современные методы междисциплинарных исследований в аспекте внедрения в практическую медицину» (Санкт-Петербург, 2015), на 1-й и 2-й Всероссийской научно-практической конференции «NGS в медицинской генетике» (Суздаль, 2016, 2017), на Российском конгрессе с международным участием «Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное» (Санкт-Петербург, 2017), на Всероссийской школе по муковисцидозу с международным участием «Персонализированная медицина и муковисцидоз» с учебным курсом «Персонализированный диагноз при муковисцидозе» (Коломна, 2018), на Первом Национальном конгрессе с международным участием «ЛАБРИН 2019» (Москва, 2019), на V Юбилейном российском конгрессе лабораторной медицины (Москва, 2019), на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные подходы и перспективы в оказании медицинской помощи больным с врожденными и (или) наследственными заболеваниями» (Санкт-Петербург, 2019), на Пятом Российском Конгрессе с международным участием «Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное» (Санкт-Петербург, 2020), на Первой онлайн научно-практической конференции «Новые технологии в диагностике и лечении наследственных болезней» (Москва, 2020).

#### **Личный вклад автора**

Автор лично участвовала в планировании и организации научной работы. Диссертант самостоятельно сформировала группы обследуемых, выполнила молекулярно-генетическое исследование образцов крови всех пациентов. Все материалы, представленные в диссертационном исследовании, получены, обобщены, статистически обработаны и проанализированы автором лично.

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

Тема работы, использованные материалы и методы, полученные результаты, их обсуждение, выводы и практические рекомендации соответствуют

паспорту специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика (пункты 1, 2, 4, 7).

### **Внедрение результатов исследования в практику**

Результаты исследования используются в учебном процессе на кафедре лабораторной медицины и генетики ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России (Санкт-Петербург), в программах обучения кафедры биохимии ФГБУ ВО СЗГМУ им. И.И.Мечникова и внедрены в практику работы СПбГКУЗ «Диагностический центр (медико-генетический)».

### **Публикации результатов исследования**

По материалам диссертации опубликовано 13 печатных работ, из них 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для опубликования результатов диссертационных исследований.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 105 страницах машинописного текста, содержит 25 таблиц, иллюстрирована 12 рисунками и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы (включает 151 источник, из которых 31 отечественный и 120 зарубежных).

## ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ДИАГНОСТИКЕ НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ ОБМЕНА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

### 1.1 Эпидемиология и патогенез наследственных болезней обмена

Наследственные болезни обмена (НБО) представляют собой фенотипически и генетически гетерогенную группу заболеваний, которые обусловлены дефектами ферментов, кофакторов или транспортеров метаболических путей, приводящих к нарушению обмена веществ и/или накоплению токсичных промежуточных соединений [133]. Термин “наследственные болезни обмена” был предложен в 1908 году английским врачом Арчибальдом Гарродом для описания генетических нарушений, возникающих в результате повреждения одного из путей метаболизма. Гаррод сформулировал концепцию биохимической индивидуальности каждого человека, которая является результатом кумулятивных изменений активности сложной сети ферментов организма [73].

Данная группа заболеваний на сегодняшний день насчитывает около 500 нозологий, суммарная частота которых оценивается в 1 на 800 живых новорожденных [76, 104]. На данный момент глобальных оценок вклада всех классов НБО в заболеваемость и смертность нет, однако, в 2017 году проведено крупное исследование с первыми результатами по распространенности нескольких классов НБО среди живых новорожденных в 38 странах мира. Согласно этому исследованию, распространенность НБО во всем мире составляет 50,9 на 100 000 живых новорожденных (95% ДИ=43,4-58,4) и 70587 (95% ДИ=61147-82281) новых случаев в год [141]. НБО представлены во всех этнических группах и проявляются во всех возрастах, при этом аутосомно-рецессивные заболевания характеризуются различной частотой в результате естественного отбора, генетического дрейфа, эффекта основателя и миграции из стран, где преобладает кровное родство [33].

Основная часть данных о заболеваемости была получена благодаря расширенным скрининговым программам. Так, частота НБО в Великобритании составляет 1:784 живых новорожденных, в Канаде 1: 2500, в Италии 1:3707, в

Саудовской Аравии 1:666, в Гонг-Конге 1:4122 [50, 103, 104, 150]. В России с 2006 года проводится неонатальный скрининг на 5 заболеваний, по данным которого установлена средняя частота некоторых НБО: фенилкетонурия - 1:7142, муковисцидоз 1:9552, адреногенитальный синдром (АГС) 1:8233, врожденный гипотиреоз (ВГ) 1:2941, классическая галактоземия (ГАО) 1:26918. При этом в результате этнической гетерогенности наблюдались значительные колебания частот скринируемых заболеваний в различных регионах: к примеру, частота фенилкетонурии оказалась максимальной в Северо-Западном регионе и составила 1:5293, а минимальной - в Дальневосточном ФО - 1:11688 [24].

Подавляющее большинство заболеваний из группы НБО наследуется по аутосомно-рецессивному типу. В основном заболевания проявляются только в случае наличия биаллельных – гомозиготных или компаунд-гетерозиготных - патогенных мутаций. Однако некоторые болезни из указанной группы вызваны мутациями в генах, находящихся на X-хромосоме - X-сцепленные заболевания. Следствием этого является двоякий эффект: во-первых, заболевание становится доминантным в потомстве мужского пола, наследующем мутацию; во-вторых, в результате случайной инактивации X-хромосомы, проявление заболевания может быть крайне вариабельным в различных тканях, а также в пределах одного потомства женского пола. Немногие врожденные нарушения метаболизма могут наследоваться по аутосомно-доминантному способу. Наконец, отдельные гены дыхательной цепи, кодируемые митохондриальной ДНК, наследуются по материнской линии [134].

Патогенные мутации приводят к полной или частичной потере активности кодируемого белка-фермента. В зависимости от метаболического пути последствия дефицита фермента могут включать отсутствие конечного продукта, накопление субстрата, активацию альтернативных путей с образованием токсичных промежуточных продуктов или комбинацию этих факторов [125].

Клиническая презентация НБО отличается широким спектром симптомов и может сопровождаться отдельными жизнеугрожающими состояниями, такими как кома в результате гипераммониемии или гипогликемии, или эпилептический

статус [101, 144]. В других случаях клиническая картина соответствует таковой при хроническом прогрессирующем процессе с вовлечением разных органов и систем.

Значительная часть НБО протекает с поражением нервной системы, при этом точный механизм метаболических нарушений, приводящих к аномалиям центральной нервной системы, до сих пор не изучен [15, 127]. Возможным объяснением является предположение о том, что в основе гибели нейронов лежит дефицит энергии или токсический эффект от накопления некоторых метаболитов. [65]. Таким образом, НБО приводят к повреждению мозга, иногда необратимому, через метаболическую интоксикацию или разрушение субстратов. Повреждения мозга для различных НБО могут вовлекать серое и/или белое вещество, а также субкортикальные и кортикальные ядра серого вещества [83]. В результате частого вовлечения ЦНС в патологический процесс, в клинической картине больных с НБО присутствуют симптомы двигательных и когнитивных расстройств. В связи с огромным разнообразием клинических форм НБО неврологические проявления могут проявляться как умеренной задержкой развития, так и тяжелым церебральным параличом [108].

Из-за тяжелых клинических последствий, НБО являются важной причиной заболеваемости и смертности в клинической практике, особенно в педиатрии [75]. Задержка в диагностике и лечении этих заболеваний приводит к целому ряду неблагоприятных исходов, в том числе от умеренной до тяжелой нейropsychологических дисфункции, умственной отсталости и смерти [115]. В совокупности наследственные заболевания, которые диагностируются по клиническим симптомам, составляют значительную долю (около 0,4% живых новорожденных) в структуре патологии новорожденных. При этом приблизительно 8% живых новорожденных имеют генетическое заболевание, распознаваемое в раннем детстве [38]. Это соответствует примерно восьми миллионам детей, рождающимся во всем мире каждый год, с серьезным наследственным заболеванием, определяемым как состояние, которое угрожает жизни или может привести к инвалидности [53]. Помимо психологического

бремени для семьи, каждый ребенок с генетическим расстройством при несвоевременной диагностике, как оценивалось, стоил системе здравоохранения в общей сложности 5 000 000 долларов в течение жизни [36].

Наследственные болезни обмена характеризуются чрезвычайной гетерогенностью, что затрудняет их классификацию. В настоящее время существует несколько классификаций, основными из которых являются патофизиологическая и патогенетическая [2, 81].

Патофизиологическая классификация НБО:

а) заболевания, приводящие к интоксикации: данная группа включает нарушения промежуточного обмена, которые лежат в основе острой или хронической интоксикации токсичными метаболитами, накапливающимися в результате метаболического блока. В эту группу входят нарушения обмена аминокислот (фенилкетонурия, болезнь кленового сиропа, гомоцистинурия, тирозинемия итд), большая часть органических ацидурий (метилмалоновая, пропионовая, изовалериановая), врожденные нарушения цикла мочевины, непереносимость углеводов (галактоземия, непереносимость фруктозы), интоксикации металлами (Вильсона-Коновалова, болезнь Менкеса, гемохроматоз) и порфирии. Все состояния этой группы характеризуются общими клиническими проявлениями: не вызывают эмбриофетальных нарушений, проявляются после бессимптомного интервала с клиническими признаками интоксикации, которые могут быть острыми (рвота, кома, печеночная недостаточность, тромбоэмболические осложнения) или хроническими (недомогание, задержка в развитии, эктопия хрусталика, кардиомиопатия).

б) заболевания, связанные с энергетическим обменом: включают нарушения, симптомы которых обусловлены дефицитом образования энергии или нарушением ее утилизации в печени, миокарде, мышцах, мозге и других тканях. (дефект транспортера пирувата, недостаточность пируватдегидрогеназы, нарушения цикла Кребса, нарушения окисления жирных кислот и др).

в) нарушения с вовлечением сложных молекул: данная группа объединяет заболевания, приводящие к нарушению синтеза и распада сложных молекул в

различных клеточных органеллах (лизосомные болезни накопления, пероксисомные заболевания, нарушения внутриклеточного транспорта и созревания белков).

Патогенетическая классификация НБО:

1. Наследственные болезни обмена углеводов: галактоземия; фруктоземия; гликогеновая болезнь (гликогенозы); пентозурия; агликогеноз.
2. Наследственные болезни обмена аминокислот: триптофана (болезнь Хартнупа, синдромы В6-зависимости); фенилаланина (фенилкетонурия); гистидина (гистидинемия); тирозина (тирозиноз, транзиторная тирозинемия, алкаптонурия); серосодержащих аминокислот (гомоцистинурия, «валинолейцинурия» – болезнь с запахом мочи кленового сиропа).
3. Наследственные болезни обмена липидов: плазматические липидозы (наследственные гиперлипидемии – ГЛП 1, 2А, 2Б, 3, 4, 5 типов); внутриклеточные липидозы (болезнь Гоше, болезнь Ниманна-Пика, болезнь Тея-Сакса – амавротическая идиотия); липопротеидемия; лейкодистрофии.
4. Наследственные болезни обмена веществ соединительной ткани: мукополисахаридозы; болезнь Марфана; вторичные изменения соединительной ткани при наследственных и приобретенных заболеваниях.
5. Наследственные нарушения минерального обмена: гепатолентикулярная дегенерация; пароксизмальный семейный паралич.
6. Наследственно обусловленные синдромы нарушенного кишечного всасывания (мальабсорбции): муковисцидоз; целиакия; экссудативная энтеропатия; наследственные дефекты в системе дисахаридаз кишечника (наследственная непереносимость лактозы; наследственная непереносимость сахарозы; непереносимость моносахаридов – глюкозы и галактозы).

## 1.2. Диагностика наследственных болезней обмена

В современной практике многие вмешательства, в том числе и диагностические, используемые для лечения и ведения пациентов с наследственными заболеваниями, определяются эмпирически, основываясь на



опыте врача. В то же время становятся доступными новые технологии и алгоритмы лабораторной диагностики, которые позволяют ускорить эволюцию медицинской помощи и выработать четкие, последовательные рекомендации относительно эффективной лечебной тактики и профилактики грубых нарушений [57].

Клиническая диагностика врожденных нарушений метаболизма зачастую затруднена в силу ряда причин. Во-первых, многие клиницисты считают, что, поскольку наследственные болезни обмена встречаются редко, их следует рассматривать только после исключения более распространенных состояний. Чаще всего врачи общей практики и педиатры предполагают диагноз наследственного нарушения метаболизма лишь в необъяснимых и очень неспецифических клинических случаях, таких как задержка психомоторного развития или судорожный синдром невыясненной этиологии [71]. И наоборот, многие клиницисты игнорируют большинство наиболее специфических симптомов, которые являются ключевыми для постановки диагноза [100]. Во-вторых, у новорожденного есть ограниченный спектр системных реакций на заболевание, что обуславливает неспецифичность преобладающих клинических признаков и симптомов: отказ от еды, летаргия, задержка в развитии и другие [121]. Несомненно, многие пациенты с такими дефектами погибают в периоде новорожденности до постановки диагноза, смерть часто приписывается сепсису или другим распространенным причинам [98]. Результаты классической аутопсии в таких случаях часто неинформативны и истинные причины летальных исходов не раскрываются [127]. Так, в качестве причины смерти часто подозревается инфекционное поражение, тогда как многие метаболические нарушения сопровождаются сепсисом [68]. В-третьих, одно и то же заболевание может иметь совершенно разные клинические проявления в зависимости от возраста манифестации. Несмотря на то, что большинство хорошо изученных болезней обмена проявляются в раннем детском возрасте, презентация многих из них возможна также и в зрелом возрасте [138]. В-четвертых, для диагностики определенных классов заболеваний требуется назначение специфических

лабораторных тестов. Так, по данным одного из европейских исследований, в условиях общей клинической генетики показатель диагностики по клиническим симптомам составляет всего 50% [128]. В более широком диапазоне редких заболеваний диагностические показатели еще ниже. Например, в программе по изучению сложных не диагностированных случаев наследственных заболеваний “Undiagnosed Diseases Program” Национального института здравоохранения США показатель правильной диагностики составил 34% у взрослых и 11% у детей [81]. Более того, время диагностики часто затягивается, в европейском обзоре, в котором изучалось время постановки диагноза восьми редких заболеваний, включая муковисцидоз, обнаружено, что в 25% случаев оно составляло от 5 до 30 лет, из них в 40% был неправильным первоначальный диагноз [32].

Поскольку спектр нарушений метаболизма при НБО довольно широк, то для лабораторной диагностики каждого заболевания используется свой набор диагностических методов с определением специфических маркеров болезни [132]. Ввиду большого числа НБО может показаться, что их диагноз требует точной оценки большого количества биохимических путей и их взаимосвязей. На самом деле, адекватный подход к диагностике может быть основан на правильном использовании только нескольких специфичных тестов. Для наследственных болезней обмена такими тестами являются биохимические и молекулярно-генетические. В настоящее время диагностический набор инструментов для биохимической диагностики НБО включает в себя исследование целевых анализов, основанных на технологиях масс-спектрометрии с газовой хроматографией (ГХ-МС), тандемной масс-спектрометрии (МС-МС), а также исследования уровней активности ферментов. Молекулярно-генетическая диагностика позволяет идентифицировать патогенные варианты в ДНК и используется с целью постановки и уточнения диагноза, определения прогноза, а также для лечения заболевания. Для диагностики НБО широко используются методы, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР), которые позволяют обнаружить один или несколько генетических вариантов за один запуск,

микроматричный анализ, капиллярное секвенирование и массовое параллельное секвенирование ДНК [146].

Манифестация в раннем детском возрасте является более распространенной для группы НБО в связи с тем, что в неонатальном периоде в организме ребенка преобладают процессы катаболизма, а большая часть функционально-важных ферментативных систем еще не до конца сформирована [90, 118]. По этой причине диагностику генетических метаболических нарушений важно проводить в пресимптоматической фазе, прежде чем нарушение метаболизма повлияет на физическое и нервно-психическое развитие [123]. В настоящее время во многих странах мира с этой целью проводится массовый скрининг новорожденных на НБО.

### **1.3. Неонатальный скрининг наследственных болезней обмена**

Неонатальный скрининг – как одна из наиболее успешных программ общественного здравоохранения XX века - представляет собой диагностическую технологию сплошного безвыборочного лабораторного обследования всех новорожденных на некоторые заболевания обмена веществ. Целью НС является выявление детей с серьезными врожденными нарушениями на доклинической стадии для предотвращения развития симптомов и коррекции осложнений заболевания [107].

В действительности, идея массового скрининга была совершенно новой для общества до 1934 года, когда норвежский врач Ивар Асбьёрн Фёллинг открыл заболевание - фенилкетонурию (ФКУ), являвшегося причиной умственной отсталости многих детей, а чуть позже американский микробиолог Роберт Гатри внедрил простой и достоверный скрининговый тест определения фенилаланина в крови [85]. «Тест Гатри», разработанный в 1960-е годы, позволил проводить быстрое и масштабное тестирование детей на фенилкетонурию [38, 86]. Предыдущие работы показали, что диета с низким содержанием фенилаланина является эффективной для предотвращения умственной отсталости, если она начата вскоре после рождения до проявления клинических симптомов [149].

Благодаря пониманию патогенеза и возможности эффективного лечения, а также профилактики умственной отсталости, было предложено тестировать всех новорожденных на ранней асимптоматической стадии. На основе опыта успешного применения скрининга на ФКУ, постепенно в программы неонатального скрининга были добавлены другие заболевания, например, муковисцидоз [122], болезнь кленового сиропа, галактоземия, гомоцистинурия [128]. С разработкой тестов для адекватного выявления этих расстройств и появлению лечения неонатальный скрининг продолжал расти и в конечном итоге был внедрен в качестве фундаментальной практики общественного здравоохранения.

В 1968 году Wilson и Jungner опубликовали рекомендации с критериями по включению заболеваний в структуру массового скрининга новорожденных [147]. Авторы критериев подчеркнули важность рассмотрения клинической и аналитической обоснованности, полезности, социальных и этических вопросов, а также экономическую эффективность программ скрининга.

Одним из условий для проведения скрининга на определенное заболевание является высокая распространенность последнего в обследуемой популяции. В связи с этим, в разных странах программы неонатального скрининга включают разный спектр заболеваний.

#### **1.4. Неонатальный скрининг как часть государственной системы здравоохранения**

Неонатальный скрининг — это управляемая государством программа, которая гарантирует, что каждый новорожденный с отклоняющимся от нормы результатом скрининга впоследствии будет направлен на соответствующее обследование и лечение [95].

Однако программа НС сводится не только к проведению лабораторных тестов, определяющих аномально высокие или низкие концентрации маркерных метаболитов. В идеале, программа скрининга состоит из пяти последовательных этапов: первичное тестирование новорожденных, проверка аномального

результата скрининга, проведение подтверждающих лабораторных исследований, интерпретация результатов и лечебные мероприятия, наблюдение пациента с подтвержденным заболеванием, а также системная оценка программы скрининга [138].

Несмотря на наличие различий по составу скринируемых заболеваний и технологиями для их диагностики, программы скрининга разных государств имеют одинаковые этапы [95], которые представлены на рисунке 1.



Рисунок 1. Основные этапы скрининговых программ.

Первичное тестирование - как компонент системы скрининга - начинается со сбора высушенных образцов пятен крови из родовспомогательных учреждений, а также базовой демографической информации о новорожденном и матери [69, 99]. Образцы крови получают через 72-96 часов после рождения и транспортируют в назначенную скрининговую лабораторию. В лаборатории образцы регистрируются и проводятся скрининговые тесты, после чего результаты интерпретируются в соответствии с принятыми руководящими принципами. Аномальные результаты, свидетельствующие о высоком риске для

конкретного заболевания, проверяются повторным исследованием из того же материала.

В случае получения повышенных результатов скрининга родители новорожденных получают уведомление о необходимости проведения дополнительного забора материала и вторичного исследования, а также дальнейшего назначения подтверждающих диагностических тестов. Диагностическое тестирование для подтверждения заболевания, в отличие от скрининговых тестов, требует более сложных тестов, которые имеют более высокую специфичность.

После того, как новорожденному диагностировано заболевание, система НС обеспечивает ему соответствующий доступ к необходимым медицинским услугам (например, педиатрическая помощь, генетическое консультирование, специальные продукты питания).

Для соблюдения принципов надлежащей клинической практики лаборатории, осуществляющие неонатальный скрининг, должны соответствовать требованиям внешней аккредитации [143]. Качество нелабораторных компонентов системы скрининга обычно также подлежит оценке. Кроме того, для эффективной работы необходима системная оценка программы скрининга, которая включает регулярный и своевременный обмен информацией между специалистами детских учреждений здравоохранения, скрининговых лабораторий и органов здравоохранения [107].

Благодаря постоянному развитию и внедрению новейших технологий в диагностический процесс, программы скрининга также модернизируются. Так, в настоящее время по рекомендациям экспертов скрининга новорожденных Американского общества медицинских генетиков (American College of Medical Genetics), состав панели для скрининга включает 49 заболеваний из группы НБО, определяемых с использованием так называемой «таргетной метаболомики» [92]. В последние десятилетия, благодаря появлению мультиплексных технологий, таких как тандемная масс-спектрометрия, стало возможным определять десятки маркеров в одном исследовании. Это создает предпосылки для расширения

спектра тестируемых заболеваний, являющихся потенциальными кандидатами для скрининга [110]. При этом внедрение их в программы не всегда практично, за счет комплекса затрагиваемых аспектов: этических, экономических, организационных и медицинских [12].

Некоторые программы скрининга включают «таргетный анализ мутаций» в качестве второго этапа скрининга для подтверждающей диагностики в случае повышенных результатов биохимических тестов [80]. Расширение НС вело к существенной выгоде в диагностике и лечении многих заболеваний и в то же время к непреднамеренным последствиям в виде гипердиагностики, ненужного лечения и беспокойства родителей [143]. Одним из таких последствий массового скрининга явилось обнаружение пациентов с частичным дефицитом некоторых ферментов (например, частичная биотинидазная недостаточность, или галактоземия типа Дуарте), не требующих назначения медикаментозного лечения [77]. Вместе с тем при проведении скрининга часто обнаруживаются формы заболеваний с поздним началом клинических проявлений, такие как недостаточность очень длинноцепочечной ацил-КоА-дегидрогеназы, при которых необходимость лечения возникает только во взрослом возрасте. Эти пациенты регулярно направляются в специализированные медицинские центры для проведения дорогостоящих подтверждающих тестов, за которыми иногда следуют неэффективное лечение, повторные визиты, беспокойство семьи, а также приводят к необоснованной перегрузке системы здравоохранения [84].

Программы скрининга наследственных болезней обмена нуждаются в периодическом пересмотре, это связано с несколькими факторами: возрастающий интерес к массовому обследованию новорожденных как к универсальной генетической скрининг-программе; внедрение новых технологий, таких как тандемная масс-спектрометрия и новые технологии исследования ДНК; а также, постоянное изменение демографической ситуации, которые подчеркивают важность генетической изменчивости и состава популяции [35]. Мероприятия массового обследования новорожденных требуют скоординированной системы последующей деятельности в части диагностики и лечения.

Система неонатального скрининга – очень важна и имеет исключительно позитивный эффект для диагностики редких и тяжелых наследственных заболеваний. Однако опыт, приобретенный в ходе существующих программ скрининга, должен способствовать дальнейшей оптимизации алгоритмов скрининговых исследований [41]. Развитие генетики и прогресс в изучении метаболических процессов в глобальном масштабе – быстрорастущие области деятельности и в скором будущем несомненно найдут свое применение в массовом скрининге новорожденных. Комплексные подходы с использованием исследований в области геномики, транскриптомики и метаболомики позволяют анализировать биологическую информацию во взаимосвязи. Быстрая модернизация диагностических технологий и внедрение генетических тестов наряду с другими биомаркерами в неонатальный скрининг позволяют детектировать больше генетических заболеваний [129].

История массового скрининга новорожденных в России началась в 1980-х годах, когда в виде пилотных исследований в нескольких регионах страны (Московская область, Воронеж, Новосибирск) стали проводить скрининг на фенилкетонурию и врожденный гипотиреоз. В 1993 году после разработки и утверждения президентской программы «Дети России», а также подпрограмм «Дети-инвалиды» и «Здоровый ребенок», неонатальный скрининг стартовал на федеральном уровне [29]. С 2006 г. в рамках национального проекта «Здоровье» во всех регионах страны в программу массового обследования новорожденных были добавлены исследования на галактоземию, адреногенитальный синдром и муковисцидоз [Приказ Минздравсоцразвития РФ от 22 марта 2006 г. N 185 «О массовом обследовании новорожденных детей на наследственные заболевания»]. По данным Росстата, в 2019 году младенческая смертность в России снизилась до 4,9 случаев (с 5,1 в 2018 году) на 1000 новорожденных, при этом врожденные аномалии занимают второе место среди причин младенческой смертности и являются основными заболеваниями в структуре инвалидности. Поэтому с целью повышения эффективности ранней диагностики наследственных заболеваний, способствующей своевременному началу лечения и профилактике



инвалидизации, с 1 января 2023 года в программу массового скрининга наследственных болезней обмена добавлены еще 36 заболеваний: дефицит биотинидазы, нарушения обмена тирозина, болезнь с запахом кленового сиропа мочи, нарушения обмена аминокислот с разветвленной цепью, нарушения обмена жирных кислот, нарушения обмена серосодержащих аминокислот, нарушения обмена цикла мочевины, детская спинальная мышечная атрофия 1 типа, первичные иммунодефициты [Приказ Министерства Здравоохранения РФ от 13 июля 2022 г. N 274 н]. В рамках данной программы проводится исследование методом тандемной масс-спектрометрии биохимических маркеров заболеваний, для которых существуют разработанные схемы лечения, основанные на диетотерапии.

#### **1.4.1. Муковисцидоз**

Муковисцидоз – наиболее распространенное аутосомно-рецессивное генетическое жизнеугрожающее заболевание, частота которого по данным неонатального скрининга составляет 1 на 3000-4000 живых новорожденных в европейской популяции [74].

Несмотря на то, что в патогенетический процесс вовлечены многие органы, главной причиной тяжелых осложнений и смертности при муковисцидозе являются поражения бронхолегочной системы [70]. С момента первого описания заболевания как нарушения экзокринной функции поджелудочной железы с легочными симптомами в 1938 году [64], средняя продолжительность жизни пациентов с муковисцидозом увеличилась до 40 лет благодаря антибиотикотерапии и коррекции синдрома мальабсорбции [52].

После открытия в 1989 году гена – регулятора трансмембранной проводимости CFTR – ответственного за развитие муковисцидоза отправной точкой в подходах к лечению стала стратегия в исследованиях возможностей генной терапии [39, 117]. Ген CFTR кодирует одноименный белок, включающий два мембрано-связывающих домена, каждый из которых состоит из шести альфа-спиралей, двух нуклеотидсвязывающих цитоплазматических доменов и регуляторного домена с несколькими консенсусными последовательностями для

фосфорилирования протеинкиназой А и протеинкиназой С. Белок CFTR относится к семейству АТФ-связывающих кассетных трансмембранных белков [91]. Он осуществляет транспорт хлорид-ионов и локализуется на апикальной мембране секреторных эпителиальных клеток [67]. В качестве транспортера хлорид-ионов, CFTR играет ключевую роль в гидратации слизи, вырабатываемой эпителием дыхательных путей [49]. Дегидратация слизи приводит к нейтрофильной воспалительной инфильтрации и инфекционной колонизации дыхательных путей, начинающимися в первые месяцы жизни [131]. Однако эти нейтрофилы оказываются неспособными полностью очистить слизистую от бактерий, что приводит к рецидивирующей инфекции легких, чаще всего синегнойной палочкой и золотистым стафилококком. Кроме того, нейтрофилы вырабатывают протеазы, главным образом эластазы, активные формы кислорода, которые ухудшают дыхательную функцию, что в конечном итоге приводит к дыхательной недостаточности, снижению качества и продолжительности жизни.

Белок CFTR также высоко экспрессируется на апикальной поверхности кишечного эпителия, в клетках протоков поджелудочной железы и холангиоцитах желчных протоков, которые в здоровом организме участвуют в транспорте ионов и жидкости в просвет органов [112]. Таким образом, дисфункция CFTR приводит к образованию вязкого секрета и обструкции желчевыводящих путей и протоков поджелудочной железы [51]. Желудочно-кишечные проявления включают недостаточность поджелудочной железы, мекониальный илеус, синдром дистальной кишечной непроходимости, а также осложнения в виде цирроза печени и печеночной недостаточности вследствие закупорки желчевыводящих путей [96]. Ген CFTR, длиной в 250 пар оснований, находится на 7 хромосоме и состоит из 27 экзонов. Международный Всемирный Консорциум лабораторий молекулярной генетики тщательно проанализировал варианты последовательностей нуклеотидов и на сегодняшний день зарегистрировано более 2000 мутаций и примерно 200 из них ассоциированы с развитием муковисцидоза [135]. Самой распространенной мутацией в гене CFTR является делеция фенилаланина в 508 позиции полипептидной цепочки – F508del – на долю

которой приходится от 50% до 90% аллелей у пациентов из различных стран. Помимо F508del, большинство мутаций, приводящих к развитию муковисцидоза, представляют собой миссенс-варианты (42%), нонсенс-варианты (10%), сдвиг рамки считывания (15%), мутации сайтов сплайсинга (13%), делеции/инсерции (2%) и мутации в промоторных участках (0,5%) [46].

Всесторонний анализ последовательности гена CFTR при различных мутациях позволил определить функциональные механизмы дефектов белка. Сейчас выделяют 6 классов мутаций гена CFTR: 1) 1 класс – включает мутации, которые приводят к отсутствию синтеза белка в результате образования стоп-кодона; 2) 2 класс – мутации, приводящие к нарушению процессинга белка, вследствие неправильной сборки белка и последующим его разрушением в эндоплазматическом ретикулуме; 3) 3 класс – мутации, при которых нарушается активация функции ионного транспорта белка, при этом белок гликозилирован и располагается в плазматической мембране; 4) 4 класс – мутации, приводящие к снижению транспорта хлорид-ионов через ионные каналы; 5) 5 класс – эффектом мутаций данного класса является существенное снижение количества белка CFTR главным образом в результате нарушения сплайсинга РНК и образованию функционально неактивного белка; 6) 6 класс – мутации, приводящие к нарушению стабильности и/или закреплению белка CFTR на мембране клеток [66]. Несмотря на простоту, данная классификация позволяет сфокусировать исследования в области поиска новых лекарств в зависимости от различных белковых дефектов, что позволило разработать персонализированный подход к лечению пациентов с различным генотипом [88].

В 1960-х годах английские ученые [82] показали, что у новорожденных детей с диагнозом муковисцидоз в меконии обнаруживается повышенный уровень альбумина. Это послужило поводом для попытки внедрения первого массового скрининга новорожденных на муковисцидоз с помощью качественного исследования мекония в 1970 году. Однако по результатам данного пилотного проекта было обнаружено, что указанный тест приводит к получению около 40% ложноотрицательных результатов [116].

Следующим шагом явилось исследование панкреатических ферментов трипсина и химотрипсина в образцах фекалий новорожденных, полученных на пятый день жизни. Основными проблемами применения данного теста в качестве скринингового явился высокий процент ложноположительных результатов у недоношенных детей, обусловленных функциональной недостаточностью поджелудочной железы, а также ложноотрицательные результаты у детей, больных муковисцидозом, с сохранной функцией поджелудочной железы [60].

В 1981 году группа ученых из Новой Зеландии опубликовали результаты количественного измерения уровня иммунореактивного трипсиногена (ИРТ) у новорожденных в качестве неонатального скрининга на муковисцидоз, по данным которого процент ложноположительных результатов не превышал 3%, а ложноотрицательных случаев не было вообще [61]. Трипсиноген является одним из основных компонентов секрета поджелудочной железы человека. Его концентрация в крови является специфическим маркером функции поджелудочной железы. Существует несколько молекулярных форм ИРТ, основные из которых трипсиноген 1 и трипсиноген 2 секретируются экзокринными клетками поджелудочной железы [87].

В настоящее время скрининг на МВ проводится во многих Европейских странах, Северной Америке и Австралии. В Лондоне и Юго-Восточной Англии муковисцидоз включен в массовый скрининг новорожденных в 2007 году [102]. Алгоритмы скрининга муковисцидоза включает разные стратегии: двухэтапное исследование уровня ИРТ (ИРТ/ИРТ), исследование ИРТ с последующим проведением потового теста (ИРТ/ПТ), тест ИРТ и анализ ДНК (ИРТ/ДНК), двукратное измерение ИРТ с анализом ДНК (ИРТ/ДНК/ИРТ) [145]. В России скрининг новорожденных на муковисцидоз проводится по схеме двухэтапного определения концентрации ИРТ.

#### **1.4.2. Фенилкетонурия**

Фенилкетонурия (ФКУ) — наследственное заболевание, в основе которого лежит нарушение аминокислотного обмена. Это заболевание было впервые описано в 1934 году у двух sibсов доктором Фоллингом [79], а в 1937 Джервис с

коллегами описал причину развития данного заболевания – дефицит фенилаланингидроксилазы, приводящий к невозможности превращения аминокислоты фенилаланина в тирозин [124]. Указанные нарушения приводят к накоплению фенилаланина в мозге и, как следствие, тяжелым нейрокognитивным и двигательным поражениям.

В настоящее время нарушения обмена фенилаланина объединяют в группу аутосомно-рецессивных заболеваний - гиперфенилаланинемии, которые включают классическую фенилкетонурию, обусловленную дефицитом фенилаланин- гидроксилазы, и ВН4-дефицитную гиперфенилаланинемию, развивающуюся в результате дефицита ферментов, участвующих в цепи биохимических превращений тетрагидробиоптерина [18].

Классическая фенилкетонурия встречается в 98% случаев гиперфенилаланинемии и развивается в результате мутаций в гене PAH, располагающемся в регионе 12q22-q24.2. Ген PAH, кодирующий фенилаланингидроксилазу, располагается на 12 хромосоме и состоит из 13 экзонов и 12 интронов, покрывающих в общей сложности 100 килобаз генетических данных. В настоящее время известно более 950 генетических вариантов, ассоциированных с недостаточностью фермента [132]. Большую часть мутаций составляют миссенс-варианты (60%), приводящих к нарушению сборки белка и/или потере каталитической функции.

Группа ВН4–дефицитных гиперфенилаланинемий встречается в 2-3% случаев и объединяет несколько генетически-гетерогенных форм, связанных с дефектом кофактора фенилаланингидроксилазы - тетрагидробиоптерина (ВН4):

1) ВН4–дефицитная ГФА тип А - обусловлена мутациями структурного гена PTS, которые приводят к недостаточности 6-пирувоилтетрагидроптерин-синтазы (PTPS), участвующей в процессе синтеза тетрагидробиоптерина из дигидронеоптерин трифосфата;

2) ВН4–дефицитная ГФА тип В - развивается в результате мутаций в гене GCH1 и недостаточности гуанозинтрифосфатциклогидролазы 1 (GTPCH), которая функционирует на начальных этапах синтеза ВН4;

3) ВН4–дефицитная ГФА тип С - связана с мутациями гена QDPR и дефицитом дигидроптеридинредуктазы (DHPR), которая контролирует восстановление ВН4 из дигидробιοптерина, обеспечивая его реактивацию;

4) ВН4–дефицитная ГФА тип D - обусловлена дефицитом птерин-4-αкарбиноламиндегидратазы (PCD), кодируемой геном PCBD, которая также участвует в восстановлении ВН4;

5) ДОФА-зависимая дистония - обусловлена дефицитом фермента сепиапте-ринредуктазы (SPR), который принимает участие в заключительном этапе синтеза ВН4, заболевание развивается в результате мутаций в гене SPR.

В 1960 году фенилкетонурия стала первым заболеванием, идентифицируемым с помощью универсальной программы скрининга новорожденных [124]. До появления скрининга ФКУ обычно диагностировали после того, как родители отмечали задержку развития у детей и к тому времени часто происходило необратимое повреждение головного мозга [97].

В России неонатальный скрининг на фенилкетонурию был начат с 1980-х годов с использованием теста Гатри. С 1989 года лабораторная диагностика фенилкетонурии основана на количественном измерении фенилаланина в сухом пятне крови с помощью флуориметрического метода. В зависимости от степени дисфункции фермента и уровня фенилаланина в крови, от которых зависит тактика лечения больных, выделяют легкую, умеренную и тяжелую гиперфенилаланинемию. Назначение диетотерапии, ограничивающей поступление фенилаланина с пищей, проводится всем новорожденным с уровнем фенилаланина в крови выше 360 мкмоль/л в течение первых 10 дней жизни [18]. Генотипирование не является обязательным для диагностики фенилкетонурии, однако данные о генетических вариантах позволяют определить степень дисфункции белка, остаточную активность фермента и, следовательно, метаболический фенотип. Данные о биохимическом и метаболическом разнообразии могут быть полезными в коррекции гиперфенилаланинемии и правильном ведении новорожденных с ФКУ [63].

Частота ФКУ в Российской Федерации, определенная по результатам неонатального скрининга, значительно варьирует от 1:3000 в Карачаево-Черкесии до 1:18000 в Республике Тыва и в среднем по стране составляет 1:7142 [1]. Средний охват новорожденных неонатальным скринингом в РФ составляет около 98,9%, заболевание диагностируется сразу после рождения, что способствует раннему началу лечебно-профилактических мероприятий и повышению качества жизни пациентов [5, 6].

### 1.4.3. Галактоземия

Классическая галактоземия – редкое аутомно-рецессивное нарушение обмена углеводов, при котором в организме накапливается избыток галактозы и ее метаболитов (галактозо-1-фосфата и галактитола), что обуславливает клиническую картину заболевания и формирование отсроченных осложнений. Распространенность галактоземии широко варьирует в различных популяциях и составляет от 1:16000 до 1:60000 живых новорожденных [37, 59]. По данным неонатального скрининга частота галактоземии в России составляет 1:16242, при этом подавляющее большинство случаев заболевания обусловлено мутациями в гене GALT.

Галактоза, являясь ключевым источником энергии у грудных детей, играет важную структурную роль, особенно в раннем развитии [55]. По химической структуре галактоза является природной альдогексозой, которая встречается главным образом в D-конфигурации. Она присутствует в свободной и связанной форме в составе сложных углеводов (таких как олигосахариды и полисахариды, гликопротеины и гликолипиды). Наряду с глюкозой, галактоза образует дисахаридную лактозу, присутствующую в большинстве видов молока животных и являющуюся ключевым источником энергии для младенцев. Лактоза гидролизуется в тонкой кишке с помощью фермента лактазы до глюкозы и галактозы. Далее галактоза транспортируется через мембрану энтероцитов с помощью активного переносчика натрия/галактозы SGLT1, а также посредством облегченной диффузии с помощью транспортера GLUT2 через базолатеральную мембрану энтероцитов. При попадании в кровоток она доставляется портальной

венной в печень – в основной орган метаболизма галактозы – где усваивается низкоаффинным белком GLUT2 [149]. Для утилизации галактозы и превращения её в глюкозу существует несколько ферментативных реакций, которые протекают в цитоплазме клеток и известны под названием пути Лелуара. Этот путь превращает  $\alpha$ -D-галактозу в глюкозо-1-фосфат (Glc-1-P) под действием трех ферментов: галактозо-1-фосфатуридилтрансферазы (ГАЛТ), галактокиназы (ГАЛК) и уридиндифосфат(УДФ)-галактозо-4-эпимеразы (ГАЛЭ). Глюкозо-1-фосфат, продуцируемый путем Лелуара, превращается фосфоглюкомутазой в глюкозо-6-фосфат для дальнейшей метаболизации через 1) гликолитический путь; 2) пентозофосфатный путь; или 3) глюконеогенез [56].

Снижение активности любого из трех ферментов – ГАЛТ, ГАЛК или ГАЛЭ – приводит к накоплению в крови метаболитов, таких как галактоза, галактоза-1-фосфат, галактитол и галактонат, а также к дефициту УДФ-галактозы и УДФ-глюкозы. Организм человека способен метаболизировать большие количества галактозы, о чем свидетельствует ее быстрое выведение из крови: 50% радиоактивно-меченной галактозы оказывается в пулах глюкозы в течение 30 минут после внутривенного введения. Для грудных детей преобразование галактозы в глюкозу имеет решающее значение для поддержания эугликемии, поскольку 40% энергии освобождается в результате гидролиза лактозы с образованием галактозы и глюкозы [55].

Избыток галактозы в организме может метаболизироваться другими биохимическими путями: в присутствии НАДФ·Н (или НАД·Н) она может превращаться в галактитол. Накопление галактитола в крови и тканях и повышение его экскреции с мочой наблюдается при всех формах галактоземии; в хрусталике глаза избыток галактитола способствует формированию катаракты. Кроме того, было описано, что накопление галактозо-1-фосфата ингибирует активность других ферментов, участвующих в углеводном обмене (фосфоглюкомутазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы), следствием чего является гипогликемический синдром.



Существуют три типа галактоземии, в зависимости от дефекта одного из трех основных ферментов, участвующих в метаболизме галактозы:

I. Классическая - галактоземия I типа, обусловленная дефицитом фермента галактозо-1-фосфатуридилтрансферазы (ГАЛТ).

II. Недостаточность галактокиназы (ГАЛК) (галактоземия II типа).

III. Дефицит уридиндифосфат-галактозо-4-эпимеразы (ГАЛЭ или эпимеразы) – галактоземия III типа.

Наиболее тяжелой формой нарушения метаболизма галактозы является классическая галактоземия, при которой активность фермента галактозо-1-фосфатуридилтрансферазы не превышает 5% от нормальных значений. Клинические проявления при данном заболевании обычно манифестируют в течение первых нескольких дней жизни после начала кормления. Начальные симптомы включают отказ от еды, рвоту и диарею, гепатоцеллюлярные повреждения, летаргию и гипотонию. Нарастающий синдром интоксикации может включать развитие сепсиса, вызванного грамотрицательными микроорганизмами, катаракты и псевдоопухоли головного мозга. Прогрессирование симптомов при отсутствии лечения приводит к развитию полиорганной недостаточности и летальному исходу [42].

К типу классической галактоземии также относится вариант Дуарте - более легкая форма галактоземии, обусловленная наличием в генотипе одного аллеля Дуарте - p.N314D (этот аллель принято обозначать символом D (Duarte)) и аллеля классической галактоземии (обозначается символом G). При данном варианте (D/G) у больных активность ГАЛТ составляет 5 – 25% от нормы. В случае наличия в генотипе двух аллелей Дуарте в гомозиготном состоянии (D/D), активность фермента равна приблизительно 25%. Тяжелые клинические проявления у таких детей в периоде новорожденности обычно отсутствуют, однако обращает на себя внимание длительная желтуха (до 2 месяцев), увеличение размеров печени. Кроме того, может наблюдаться плохая прибавка в массе тела, задержка физического развития, темповая задержка моторного

развития. В настоящее время пациенты с вариантами галактоземии G/D и D/D не требуют специального лечения [72].

Существует несколько тестов для диагностики классической галактоземии. Скрининговые тесты на содержание метаболитов в моче может быть информативным, но обладают недостаточной чувствительностью и специфичностью, что приводит к ложноположительным результатам при фруктозурии, лактозурии или при состояниях, которые нарушают клиренс галактозы в крови (тяжелые заболевания печени, лечение антибиотиками). Напротив, если ребенок находится на внутривенном питании, галактозурия может отсутствовать, что приводит к ложноотрицательным результатам [48]. Более специфичным подходом является измерение метаболитов, таких как галактоза, галактозо-1-фосфат и галактитол в крови - у пациентов с галактоземией наблюдаются неизменно их уровни. Тем не менее, доброкачественные варианты галактоземии (варианты Дуарте) также могут вызывать повышение уровня галактозы и галактозо-1-фосфата. Золотым стандартом диагностики является измерение активности фермента GALT в эритроцитах, которое может быть выполнено с помощью полуколичественного флуоресцентного точечного теста Бейтлера, либо количественным анализом [62]. В настоящее время во многих лабораториях доступен анализ мутаций гена GALT и в некоторых программах скрининга используется в качестве подтверждающего теста.

Необходимость проведения неонатального скрининга на галактоземию обсуждалась годами, но консенсус достигнут не был. Галактоземия была исключена из некоторых программ скрининга новорожденных на основании двух главных аргументов: она может быть диагностирована клинически, и, несмотря на раннее начало лечения, могут развиваться отсроченные осложнения. В более позднем исследовании сравнивалось 139 детей с различными метаболическими заболеваниями, выявленными с помощью неонатального скрининга (17 из них с классической галактоземией), со 124 детьми, диагноз у которых был установлен на основании данных клинической картины (9 с классической галактоземией). Был сделан вывод о том, что, несмотря на сходный уровень госпитализации,

умственная отсталость отмечалась у 47% в группе клинически идентифицированных детей и всего в 14% случаев из тех, кто был выявлен при скрининге новорожденных [138]. В нашей стране неонатальный скрининг на галактоземию проводится с использованием двухэтапного определения концентрации общей галактозы в сухом пятне крови.

#### **1.4.4. Методы лабораторной диагностики в неонатальном скрининге РФ**

Все наследственные болезни обмена имеют одинаковый механизм действия на молекулярном уровне, который вызван патогенной мутацией в определенном локусе гена [43]. Используя подход биохимического скрининга для наследственных болезней обмена, в нашей стране проводят ряд тестов, которые разработаны для измерения продуктов метаболических процессов (аналитов), регулируемых этими генами [24]. Новорожденные, у которых идентифицированы аномальные концентрации конкретного аналита, могут иметь дисфункциональный фермент и, таким образом, входят в группу высокого риска по данному заболеванию. В идеале, скрининговые тесты должны быть способны идентифицировать и отличать младенцев, у которых есть искомое заболевание от здоровых, требуя достаточной чувствительности и специфичности для обеспечения должной эффективности скрининга [107]. Традиционно, как и большинство программ, протоколы НС в России учитывают необходимость чрезвычайно высокой чувствительности во избежание пропущенных случаев. В основном биомаркеры являются очень точными предикторами болезни, поэтому специфичность биохимических тестов довольно высока. Помимо чувствительности и специфичности в скрининговых программах важными характеристиками являются значения прогностической ценности положительного и отрицательного результатов. Положительная прогностическая ценность (ППЦ) - это вероятность наличия заболевания при положительном результате теста, а отрицательная прогностическая ценность (ОПЦ) - это вероятность того, что отрицательный результат теста правильно определяет человека без заболевания. В отличие от показателей чувствительности и специфичности, значения ППЦ и

ОПЦ зависят от распространенности заболевания в популяции [106]. При использовании одного и того же скринингового теста с одинаковыми значениями чувствительности и специфичности, разная распространенность заболевания приводит к получению разных значений ППЦ и ОПЦ [12]. Поскольку наследственные болезни обмена относятся к редким орфанным заболеваниям, положительная прогностическая ценность остается относительно низкой, приводя к увеличению количества ложноположительных результатов скрининга. Также фактором, снижающим специфичность скрининговых тестов, является неспецифичность биохимического фенотипа - метаболический профиль при различных нозологиях может частично совпадать, что может замедлять установление правильного диагноза [110]. Благодаря широкому внедрению и использованию приемов высокотехнологичной медицинской помощи ежегодно увеличивается количество новорожденных с низким весом или ранним сроком гестации. Такие дети чаще имеют ложноположительные результаты для некоторых из скринируемых состояний, поскольку их эндокринная система не полностью развита [94]. Как правило, глубоко недоношенных новорожденных чаще всего помещают в отделение интенсивной терапии и проведение лечебных мероприятий (например, общее парентеральное питание, введение антибиотиков, переливание крови, диета без грудного молока, пренатальное и постнатальное воздействие глюкокортикоидов), может влиять на результаты НС, вызывая колебания концентраций исследуемых аналитов [98]. При получении результатов скрининга, выходящих за пределы референтного интервала, специалисты лаборатории неонатального скрининга передают информацию специалистам поликлинических отделений по месту жительства ребенка для проведения взятия крови и повторного биохимического исследования концентрации повышенных маркеров. Согласно литературным данным при проведении расширенного скрининга новорожденных (более 20 заболеваний), истинно положительный результат обнаруживается лишь у одного ребенка из каждых 2400 обследованных младенцев, что составляет всего 0,04% [126]. Данный факт оказывает негативное влияние на пациента, семью и систему здравоохранения. Помимо влияния на

эффективность скрининга и экономическую составляющую, исследования показывают, что ложноположительные результаты могут оказать значительное влияние на психоэмоциональное состояние родителей [136, 139]. Искаженное родительское восприятие здоровья их детей может приводить к большему количеству визитов к врачам и госпитализациям, особенно в течение первого года жизни.

С целью снижения количества ложноположительных результатов программы скрининга предусматривают проведение подтверждающих тестов для каждого заболевания [114]. В России с 2006 года основным документом, регламентирующим проведение неонатального скрининга, являлся приказ Министерства Здравоохранения и социального развития №185 “О массовом обследовании новорожденных детей на наследственные заболевания”, а с 31 декабря 2022 года - приказ №274н “Об утверждении Порядка оказания помощи пациентам с врожденными и (или) наследственными заболеваниями”. В указанных документах определен перечень нозологий для проведения неонатального скрининга, утвержден порядок взятия биоматериала и направления в лабораторию неонатального скрининга, а также порядок извещения родителей детей с повышенными результатами скрининга и проведения повторных исследований. В приказах также указано, что в случае получения результатов скрининговых исследований, отклоняющихся от референтных значений, при повторном исследовании формируется группа детей высокого риска, которым необходимо проведение дополнительных исследований для подтверждения или исключения заболевания в течение 10 рабочих дней. Для каждого из 5 заболеваний, входящего в неонатальный скрининг существуют отдельные клинические рекомендации, в которых отражены диагностические схемы для лабораторного подтверждения диагноза. Однако для массовых программ необходимо учитывать возможность универсального подхода лабораторного тестирования для всех заболеваний, входящих в неонатальный скрининг. Кроме того, использование клинических рекомендаций, как правило, ограничено лечащим врачом для каждого конкретного пациента, в то время как массовый

скрининг охватывает сразу всю популяцию новорожденных детей. При этом методических рекомендаций для неонатального скрининга с едиными протоколами и четкими рекомендациями по проведению лабораторного этапа подтверждающей диагностики в настоящее время нет [25].

Таким образом, главной проблемой неонатального скрининга в России является отсутствие единых подходов для подтверждающей диагностики и обусловленный этим высокий процент ложноположительных результатов.

### **1.5. Технология высокопроизводительного секвенирования NGS**

Почти все заболевания, за исключением врожденного гипотиреоза, включенные в программу скрининга новорожденных в России (муковисцидоз, галактоземия, фенилкетонурия, врожденная гиперплазия коры надпочечников), наследуются по классическим менделевским законам, а гены, вызывающие указанные заболевания, достаточно хорошо изучены [44]. Поэтому наиболее эффективными лабораторными методами для подтверждения этих заболеваний являются молекулярно-генетические тесты.

Стремительный технологический прогресс в области молекулярно-генетических методов способствовал внедрению в диагностику генетически-детерминированных заболеваний таких инновационных методов как высокопроизводительное секвенирование (NGS). Секвенирование нового поколения, в отличие от секвенирования по Сэнгеру, позволяет осуществлять массовое параллельное прочтение огромного количества фрагментов ДНК одновременно и установить последовательность всех экзонов или даже всего генома по сравнительно низкой стоимости. Кроме того, технология массового параллельного секвенирования позволяет анализировать несколько десятков образцов за один запуск [80, 114].

Возможность анализировать множество генов одновременно благоприятствует развитию геномной медицины. Пропускная способность секвенирования геномного масштаба для исследования генов хорошо известна [54] и эта технология все больше и больше применяется в качестве

диагностического инструмента у детей с подозрением на наличие моногенного заболевания [45]. Реальный потенциал секвенирования генома более глобален в качестве составляющей части «персонализированной» медицины [57], предзнаменованной в 1990 году Вальтером Гилбертом, который заключил, что к 2030-2040 году всем новорожденным будут секвенировать весь геном [41].

Существуют аргументы в пользу того, что NGS является следующим технологическим скачком, который изменит характер скрининга, благодаря повышению его точности и получению генетической информации, которая может быть использована для обеспечения более персонализированного подхода к лечению пациентов. В связи с существенным снижением стоимости секвенирования целого генома и экзона в некоторых странах проводятся пилотные проекты с использованием геномного подхода в неонатальном скрининге [44]. Чаще всего такие проекты включают проведение скрининга в несколько этапов: биохимические тесты, ДНК-диагностика с использованием технологий ПЦР для поиска наиболее частых мутаций в соответствующих генах и расширенное генетическое тестирование с использованием технологий секвенирования [47].

Из-за опасений по поводу ряда этических и логистических проблем, связанных с полногеномным (WGS) и полноэкзомным (WES) секвенированием, в контексте применения NGS в качестве теста завершающего этапа неонатального скрининга наиболее рациональным является таргетное секвенирование (TNGS) с использованием небольших панелей генов. Таргетное секвенирование - мультиплексный анализ целевой последовательности нескольких генов - является многообещающей и эффективной стратегией в крупномасштабных исследованиях. Это обусловлено, прежде всего, относительно низкой стоимостью, быстротой (ТАТ – 3-5 дней), а также возможностью избирательного исследования регионов «интереса», что позволяет избежать этических проблем, связанных с обнаружением случайных находок [80].

Высокий процент ложноположительных результатов, обусловленных низкой распространенностью каждого заболевания в популяции, сложности,

возникающие при интерпретации неоднозначных результатов биохимического скрининга, а также отсутствие протоколов подтверждающей диагностики указывают на необходимость повышения эффективности неонатального скрининга путем разработки и оптимизации алгоритмов подтверждающей диагностики. Для разрешения этих вопросов за рубежом проводятся многочисленные исследования, в России до настоящего времени подобных работ не проводилось.

По нашему мнению, для рационализации современных подходов уточняющей диагностики моногенных заболеваний необходимо решить ряд задач, которые включают: оценку диагностической информативности существующего скринингового протокола, определение оптимальных пороговых точек используемых маркеров, разработку алгоритма с включением молекулярно-генетических методов в качестве завершающего этапа скрининга.

На основании указанных вопросов были сформулированы цель и задачи настоящей диссертационной работы. Безусловно то, что внедрение технологий секвенирования следующего поколения в неонатальный скрининг позволит аккумулировать опыт генетических исследований для теоретической и практической медицины.



## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Характеристика групп обследуемых

Для реализации поставленной цели исследования проведено проспективное исследование. На первом этапе 196217 детям, родившимся с 01.01.2015 г. по 01.01.2018 г., проведены лабораторные тесты в рамках существующего стандартного алгоритма скрининга, предполагающего определение биохимических маркеров по следующей схеме:

- муковисцидоз: первичное измерение уровня иммунореактивного трипсиногена (ИРТ1) – повторное измерение (ретест) ИРТ (ИРТ2);
- фенилкетонурия: первичное измерение уровня фенилаланина (ФА1) – ретест ФА (ФА2);
- галактоземия: первичное измерение уровня общей галактозы (ГАО1) – ретест ГАО (ГАО2).

На втором этапе по результатам скринингового тестирования было выделено 858 новорожденных с положительными результатами для дальнейшего анализа данных. Сформированы 4 группы обследуемых:

- 1) 264 новорожденных с повышенными значениями ретеста ИРТ (ИРТ2);
- 2) 80 новорожденных с повышенными значениями ретеста ФА (ФА2);
- 3) 514 новорожденных с повышенными значениями ретеста ГАО (ГАО2);
- 4) 110 здоровых новорожденных контрольной группы с нормальными значениями ФА, ИРТ и ГАО по результатам биохимического скрининга.

Критерии включения в группы: повышенные уровни ИРТ2, ГАО2 и ФА2 при проведении ретестов. Критерии исключения: одновременное повышение более чем одного маркера исследуемых заболеваний (ГАО2, ИРТ2, ФА2).

### 2.2. Исследуемые параметры

Всем новорожденным были проведены следующие лабораторные исследования:

Биохимические:

- 1) количественное определение уровня ИРТ;
- 2) количественное определение уровня ФА;

3) количественное определение уровня ГАО (галактоза + галактоза-1-фосфат).

В четырех исследуемых группах (968) для сравнения протоколов в дополнение к протоколам ИРТ1/ИРТ2, ФА1/ФА2, ГАО1/ГАО2 проведен анализ образцов ДНК методом NGS:

- 1) высокопроизводительное секвенирование NGS гена CFTR;
- 2) высокопроизводительное секвенирование NGS гена PAH;
- 3) высокопроизводительное секвенирование NGS гена GALT (рис.2).

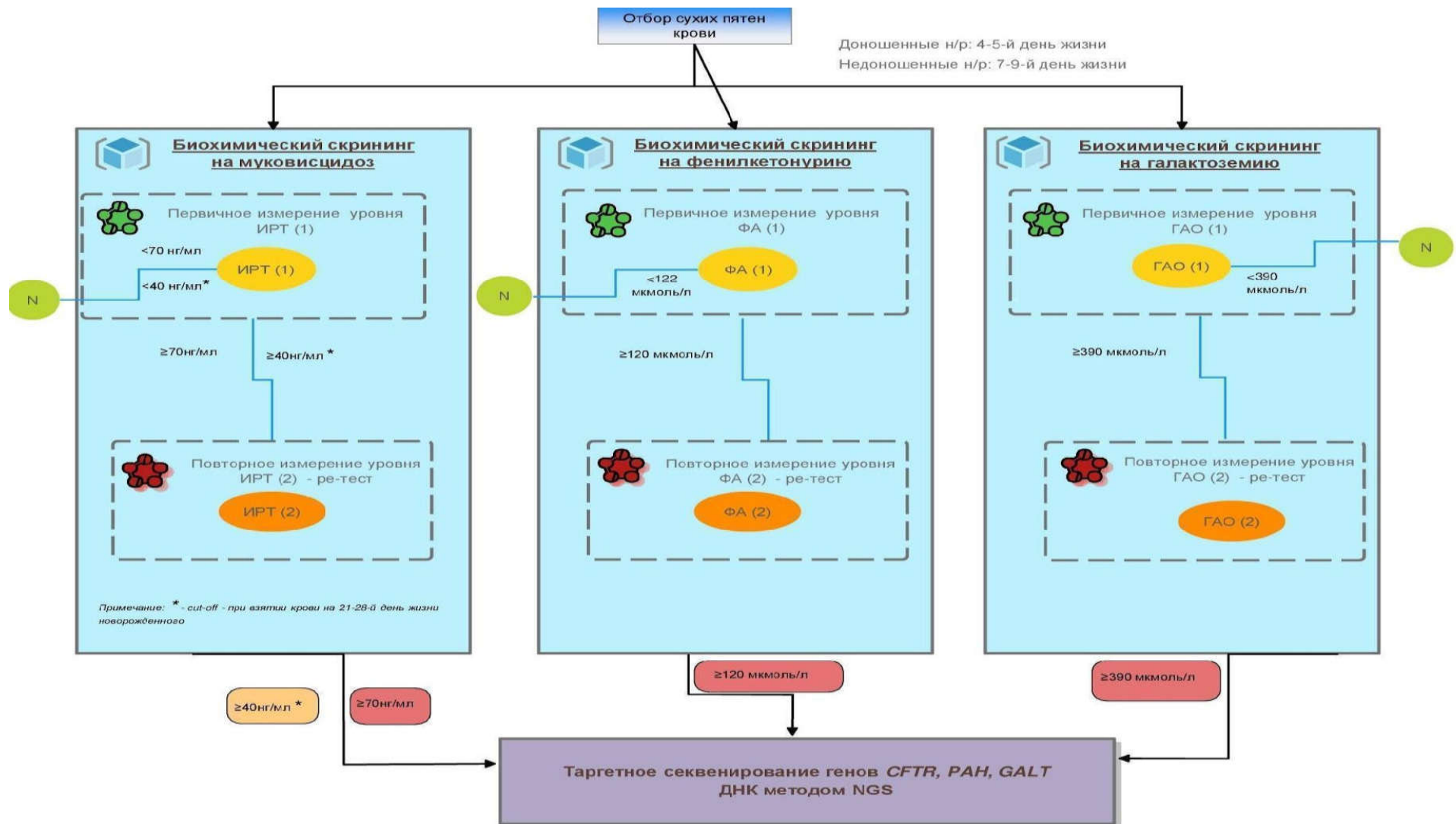


Рисунок 2. Алгоритм неонатального скрининга с включением NGS секвенирования.

Материалом для биохимических методов исследования служила капиллярная кровь, взятая в родильном доме из пятаки новорожденного на 4-5-й и 10-28-й день жизни на бланки фильтровальной бумаги. Высушенные образцы крови доставлялись курьером в лабораторию СПбГКУЗ «Медико-генетический центр». Определение метаболитов (ИРТ, ФА, ГАО) проводилось в качественно взятых образцах крови.

Для проведения молекулярно-генетических методов материалом для исследования являлись образцы ДНК, выделенные из сухих пятен крови. Выделение геномной ДНК из образцов пятен крови, нанесенных на фильтровальную бумагу, проводилось с использованием набора реактивов Invitrogen (США) в соответствии с рекомендациями производителя.

### **2.2.1 Биохимические исследования**

Количественное определение биохимических маркеров проводили на анализаторе Victor 2 (Perkin Elmer, США).

1. Иммунореактивный трипсиноген (ИРТ) - иммунофлюоресцентный метод. Референтные значения: дети от 3 до 21 дня – до 70 нг/мл, дети от 21 до 28 дней – до 40 нг/мл.

2. Фенилаланин (ФА) - флуориметрический метод. Референтные значения: дети от 3 дней до 1 года – до 122 мкмоль/л.

3. Общая галактоза (ГАО) - флюоресцентный метод. Референтные значения: дети от 3 дней до 1 года – до 390 мкмоль/л.

Референтные значения использовались в соответствии с рекомендациями производителей тест-систем: «ИРТ-Неоскрин» (Иммуноскрин, Россия), «Галактоза-Неонатал» (Perkin Elmer, Финляндия), «ФКУ-Неоскрин» (Иммуноскрин, Россия).

### 2.2.2. Молекулярно-биологические методы

Анализ 442 мутаций в гене CFTR, 99 мутаций в гене PАН, 40 мутаций в гене GALT проведен методом высокопроизводительного геномного NGS секвенирования на приборе Ion Personal Genome Machine (Life Technologies, США).

#### **Этапы геномного секвенирования:**

*Выделение ДНК.* Процесс выделения ДНК осуществлялся из сухих пятен крови с помощью набора PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen/Life Technologies, США) в соответствии с инструкцией производителя.

*Аmplификация таргетных регионов.* Для специфичной амплификации целевых регионов генов PАН, GALT и CFTR проводилась реакция ПЦР с использованием панели праймеров VariFind™ Neoscreen assay (ParseqLab, Россия) и термоциклера Veriti 96-well (Applied Biosystems, США). Необходимое количество ДНК составляло 3,3 нг/мкл.

*Создание библиотек.* Создание библиотек осуществлялось с использованием набора Ion Ampliseq Library Kit (Life Technologies, США). Клональная амплификация фрагментов ДНК методом эмульсионной ПЦР с последующим обогащением фракции сработавших сфер проводилась с использованием набора Template OT2 Reaction Kit (Life Technologies, США) и прибора One Touch 2 с модулем ES (Life Technologies Thermo Fisher Scientific). Для секвенирования использовались чипы Ion 318™ Chip Kit v2 (Life Technologies Thermo Fisher Scientific) (рисунок 3).

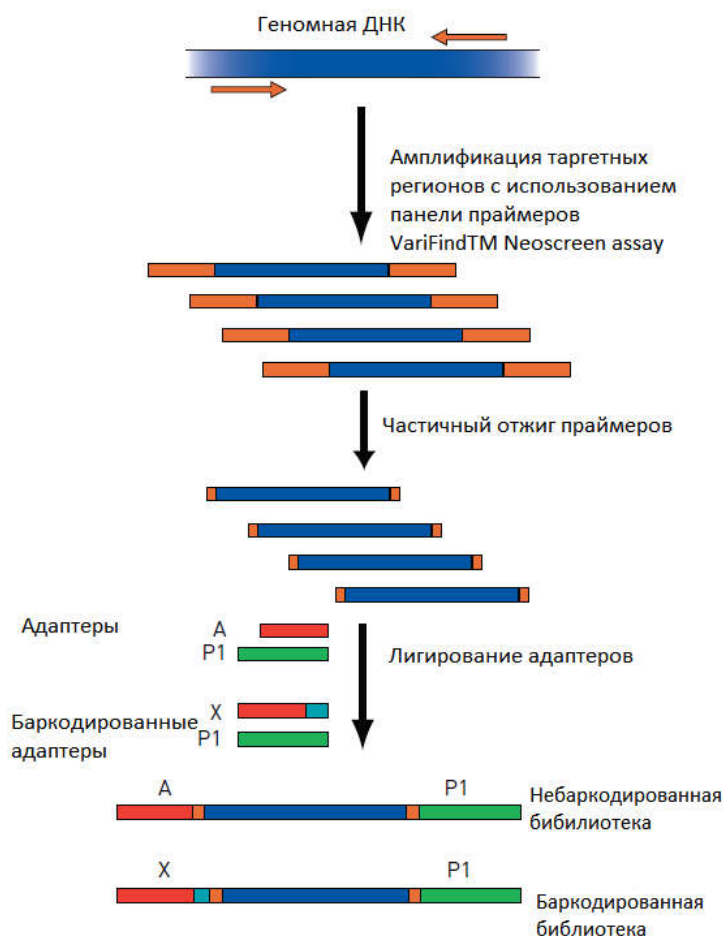


Рисунок 3. Амплификация целевых регионов и создание библиотек.

*Секвенирование и интерпретация полученных данных.* Секвенирование ДНК проводили с использованием платформы Ion PGM (Life Technologies) в сочетании с настраиваемым автоматизированным биоинформатическим источником информации для анализа и интерпретации данных VariFind v.6.0 (ParseqLab, Россия). По результатам анализа в случае обнаружения клинически значимых мутаций формировался отчет об исследовании, который служил материалом для интерпретации и постановки диагноза врачом-генетиком.

### 2.3. Статистические методы

Проведен всесторонний статистический анализ результатов исследования с использованием статистических программ: PAST, VoxPlotR, LePrep, Metabo-Analyst, EasyROC, DiagStat.xls. При обработке данных использовались методы

параметрической и непараметрической статистики, описательный и сравнительный статистические анализы. Согласно рекомендациям, использовалось значение  $p < 0,005$  как критический уровень значимости, поскольку преодоление уровня 0,05 следует рассматривать как очень слабое доказательство против нулевой гипотезы [40, 58, 93].

Для статистического описания мерных данных проверяли их согласие с нормальным распределением и оценивали средние значения, медианы с 95%-ми доверительными интервалами. Перед сравнением данных в двух независимых выборках проводили проверку согласия с нормальным распределением с помощью критериев Шапиро-Уилка ( $W$ ), Андерсона-Дарлинга ( $A$ ) и Жарка-Бера ( $JB$ ). В случае двух последних критериев использовали оценки  $P$ -значений методом Монте-Карло.

Для статистических сравнений использовали параметрические ( $F$ -критерий Снедекора-Фишера, критерии Левина,  $t$ -критерий Стьюдента, критерий Уэлча) и непараметрические критерии (Манна-Уитни ( $U$ ), Муда ( $\chi^2$ ), Колмогорова-Смирнова ( $KS$ )). Ориентировались на  $P$ -значения, полученные методом Монте-Карло.

Для множественных сравнений использованы критерий Тьюки и критерий Манна-Уитни с поправкой на множественность сравнений по Бонферрони, для вычислений использована программа PAST.

Оценка операционных характеристик лабораторных тестов производилась по следующим критериям: чувствительность ( $Se$ ), специфичность ( $Sp$ ), прогностическая ценность положительного и отрицательного результатов ( $PPV$  /  $NPV$ ), распространенность ( $Prev$ ) (таблица 1).

Критерии оценки диагностической информативности лабораторных  
тестов

Критерий	Болезнь присутствует	Болезнь отсутствует
Положительный результат	a - истинно положительный	b - ложноположительный
Отрицательный результат	c - ложноотрицательный	d - истинно отрицательный
Клиническая чувствительность (Se)	$a/(a + c)$ = доля истинно положительных результатов в группе больных	
Клиническая специфичность (Sp)	$d/(b + d)$ = доля истинно отрицательных результатов в группе здоровых	
Прогностическая ценность положительного результата (PPV)	$a/(a + b)$ = доля истинно положительных результатов среди всех положительных результатов	
Прогностическая ценность отрицательного результата (NPV)	$d/(c + d)$ = доля истинно отрицательных результатов среди всех отрицательных результатов	
Распространенность (Prev)	$(a + c)/(a + b + c + d)$ = доля больных в обследуемой группе	
Отношение правдоподобия положительного результата теста (LR[+])	$a/(a + c)/b/(b + d)$	
Отношение правдоподобия отрицательного результата теста (LR[-])	$c/(a + c)/d/(b + d)$	

Для анализа чувствительности и специфичности, выражения клинической значимости результатов и подбора оптимальной точки отсечения (cut-off) применяли ROC-анализ с использованием программ EasyROC и MetaboAnalyt. Был реализован расчет точных байесовских доверительных интервалов для пропорций ((Se, Sp, PPV и NPV) и доверительных интервалов MOVER для отношений некоторых из них (LR [+]) и LR [-]) [111]. В соответствии с международными руководящими принципами (ICMJE, 2013) статистическая



значимость наблюдаемых эффектов была проверена не только значениями  $P$ , но и доверительными интервалами (CI) для оцененных различий.

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В данной главе представлены результаты оценки диагностической информативности используемых лабораторных тестов для неонатального скрининга, рассчитаны оптимальные пороговые значения иммунореактивного трипсиногена для скрининга муковисцидоза. Также представлен новый алгоритм неонатального скрининга с использованием NGS для подтверждающей диагностики, проведен сравнительный анализ информативности предложенного и существующего диагностических методов.

#### 3.1 Оценка диагностической информативности лабораторных тестов, используемых для скрининга муковисцидоза в рамках стандартного алгоритма

В настоящее время неонатальный скрининг на муковисцидоз осуществляется с использованием двухэтапного определения иммунореактивного трипсиногена ИРТ в крови новорожденных: первый тест (ИРТ1) проводится в образце крови, полученном на 3-5 день жизни (7-10 у недоношенных детей), а второй (ИРТ2) - на 21-28-й день жизни. В таблице 2 приведены сведения о количестве обследованных детей.

Таблица 2

Результаты неонатального скрининга на муковисцидоз в г. Санкт-Петербург в 2015 – 2017 гг.

Характеристики (абсолютное количество)	2015	2016	2017	Всего
Число обследованных	72462	73631	50124	196217
Положительный ИРТ1	185	364	129	678
Положительный ИРТ2	66	154	44	264
Диагностированные случаи муковисцидоза	11	14 (13+1)*	7	32

Примечание: \* - ложноотрицательный биохимический скрининг

Повышение уровня ИРТ1 > 70 нг/мл на первом этапе скрининга отмечено у 678 новорожденных, при повторном обследовании гипертрипсиногенемия (ИРТ2 > 40 нг/мл) сохранялась у 264 детей.

Диагноз муковисцидоз в обследованной популяции был установлен 32 новорожденным, при этом повышенный уровень ИРТ2 наблюдался только у 31 ребенка, в 1 случае у ребенка с клиническими проявлениями муковисцидоза наблюдался нормальный уровень ИРТ при первичном тестировании. Причиной ложноотрицательного результата теста ИРТ в указанном случае явилось наличие мекониального илеуса – обструкции терминального отдела подвздошной кишки – патогномоничного признака муковисцидоза, который, может обуславливать низкие значения ИРТ (таблица 3).

Таблица 3

Результаты использования диагностического алгоритма ИРТ1/ИРТ2 в обследованной популяции

Результат алгоритма ИРТ1/ИРТ2	Заболевание		Всего
	Есть	Нет	
Положительный результат	31	233	264
Отрицательный результат	1	195952	195953
Всего	32	196185	196217

Проведена оценка параметров диагностической эффективности двукратного определения ИРТ1/ИРТ2 в неонатальном скрининге. При расчетах диагностической информативности использовались рекомендованные производителем cut-off для ИРТ теста: 70 нг/мл - в возрасте с 3 по 20-й день жизни; 40 нг/мл – в возрасте с 21 по 28-й день жизни для всех новорожденных. Образец с повышенными результатами двух ИРТ тестов (ИРТ1 и ИРТ2), считался положительным, в противном случае - отрицательным (таблица 4).

Характеристики информативности лабораторных тестов, используемых для скрининга муковисцидоза в рамках стандартного алгоритма (ИРТ1/ИРТ2)

Показатель	Значение	Границы доверительных интервалов			Уровень доверия
		Нижняя	Верхняя	Ширина ДИ	
Чувствительность (Se)	0,94	0,84	0,99	0,15	95%
		0,80	1,00	0,20	99%
		0,74	1,00	0,26	99,9%
Специфичность (Sp)	0,99	0,99	0,99	0,00	95%
		0,99	0,99	0,00	99%
		0,99	0,99	0,00	99,9%
Прогностическая ценность положительного результата (PPV)	0,12	0,08	0,16	0,08	95%
		0,07	0,18	0,11	99%
		0,06	0,19	0,13	99,9%
Прогностическая ценность отрицательного результата (NPV)	1,00	1,00	1,00	0,00	95%
		1,00	1,00	0,00	99%
		1,00	1,00	0,00	99,9%
Отношение правдоподобия положительного результата теста LR [+]	789	668	910	242	95%
		624	948	323	99%
		572	995	423	99,9%
Отношение правдоподобия отрицательного результата теста LR [-]	17,0	6,3	134,5	128,2	95%
		4,9	314,1	309,2	99%
		3,8	1015,8	1012,1	99,9%
Распространенность заболевания (Prev)	0,00017	0,00012	0,00023	0,00011	95,0%
		0,00010	0,00025	0,00015	99,0%
		0,00009	0,00028	0,00019	99,9%

На основании полученных результатов уровня иммунореактивного трипсиногена, а также клинических и анамнестических данных, была проведена оценка информативности существующего диагностического алгоритма биохимического скрининга муковисцидоза (ИРТ1/ИРТ2), которая установила следующее: 1) чувствительность – 94%; 2) специфичность – 99%; 3) положительная прогностическая ценность (*PPV*) – 12%; 4) отрицательная прогностическая ценность – 100%; 5) положительное отношение правдоподобия – 789; 6) отрицательное отношение правдоподобия – 17. Рассчитанная распространенность муковисцидоза в исследуемой популяции составила 0,017% ( $Prev=0,00017$ ).

Таким образом, несмотря на высокие показатели чувствительности (94%) и специфичности (99,9%), при проведении скрининга с использованием протокола ИРТ1/ИРТ2 сохраняется большая вероятность получения ложноположительных результатов (*PPV* - 12%) вследствие низкой распространенности заболевания в исследуемой популяции ( $Prev=0,00017$ ), а также не исключена возможность получения ложноотрицательных результатов теста. При проведении скрининга по протоколу ИРТ1/ИРТ2 обнаружен 1 пациент с отрицательным результатом, которому был поставлен диагноз муковисцидоз по клиническим симптомам. В данном случае причиной ложноотрицательного результата явилось наличие мекониального илеуса, который, согласно литературным данным, может обуславливать низкие значения ИРТ в крови [119].

### **3.2 Оценка диагностической информативности лабораторных тестов, используемых для скрининга фенилкетонурии в рамках использования стандартного алгоритма**

Фенилкетонурия (ФКУ) – группа наследственных заболеваний с аутосомно-рецессивным типом наследования, характеризующиеся нарушением обмена незаменимой аминокислоты фенилаланина (ФА). В результате метаболического блока превращения фенилаланина в тирозин происходит значительное накопление фенилаланина и его токсических метаболитов в биологических

жидкостях больного, что оказывает повреждающее действие на центральную нервную систему и приводит к развитию тяжёлой умственной отсталости. С целью ранней диагностики и профилактики осложнений в России проводится неонатальный скрининг ФКУ с использованием двукратного количественного определения фенилаланина в сухих пятнах крови новорожденных. Первичное определение уровня фенилаланина (ФА1) проводится на 4-5-й день жизни у доношенных и на 7-9-й день жизни у недоношенных новорожденных (cut-off-122 мкмоль/л). В случае получения повышенных значений ФА1 производится повторный забор крови и повторное определение уровня фенилаланина (ФА2). В таблице 5 приведены сведения о количестве обследованных детей при проведении неонатального скрининга на фенилкетонурию в г. Санкт-Петербург в 2015-2017 гг.

Таблица 5

Результаты неонатального скрининга на фенилкетонурию в  
г. Санкт-Петербург в 2015 – 2017 гг.

Характеристики (абсолютное количество)	2015	2016	2017	Всего
Число обследованных	72462	73631	50124	196217
Положительный ФА1	42	41	35	118
Положительный ФА2	27	35	18	80
Диагностированные случаи фенилкетонурии	10	7	5	22
Диагностированные случаи гиперфенилаланинемии	2	7	4	13

При расчетах диагностической информативности использовался рекомендованный производителем cut-off для тестов ФА1 и ФА2 - 122 мкмоль/л. Образец, имеющий данные о результатах двух тестов (ФА1 и ФА2), превышающих принятый порог, считался положительным, в противном случае

отрицательным. Повышение уровня ФА1 отмечено у 118 из 196217 обследованных новорожденных, по результатам ретеста (ФА2) гиперфенилаланинемия сохранялась у 80 новорожденных (таблица 6).

Таблица 6

Результаты диагностического алгоритма ФА1/ФА2 в обследованной популяции

Результат алгоритма ФА1/ФА2	Заболевание		Всего
	Есть	Нет	
Положительный результат	35	45	80
Отрицательный результат	0	196137	196137
Всего	35	196182	196217

Были определены следующие характеристики информативности диагностического алгоритма ФА1/ФА2: 1) чувствительность – 97%; 2) специфичность – 100%; 3) положительная прогностическая ценность – 44%; 4) отрицательная прогностическая ценность – 100%; 5) положительное отношение правдоподобия – 37; 6) отрицательное отношение правдоподобия – 4150. Распространенность заболевания составила 0,018 % ( $Prev=0,00018$ ) (таблица 7).

Таблица 7

Характеристики информативности лабораторных тестов, используемых для скрининга фенилкетонурии в рамках стандартного алгоритма (ФА1/ФА2)

Показатель	Значение	Границы доверительных интервалов			Уровень доверия
		Нижняя	Верхняя	Ширина ДИ	
Чувствительность (Se)	0,97	0,90	1,00	0,10	95%
		0,86	1,00	0,14	99%
		0,81	1,00	0,19	99,9%

Продолжение табл.7					
Специфичность (Sp)	1,0	1,00	1,00	0,00	95%
		1,00	1,00	0,00	99%
		1,00	1,00	0,00	99,9%
Прогностическая ценность положительного результата (PPV)	0,44	0,33	0,55	0,21	95%
		0,30	0,58	0,28	99%
		0,27	0,62	0,35	99,9%
Прогностическая ценность отрицательного результата (NPV)	1,00	1,00	1,00	0,00	95%
		1,00	1,00	0,00	99%
		1,00	1,00	0,00	99,9%
Отношение правдоподобия положительного результата теста LR [+]	4150	3135	5673	2538	95%
		2859	6282	3422	99%
		2561	7101	4539	99,9%
Отношение правдоподобия отрицательного результата теста LR [-]	37,0	10	1422	1412	95%
		7	7181	7174	99%
		5	71988	71983	99,9%
Распространенность заболевания (Prev)	0,00018	0,00013	0,00025	0,00012	95,0%
		0,00011	0,00027	0,00016	99,0%
		0,00010	0,00030	0,00020	99,9%

При оценке предсказательной способности биохимического тестирования в алгоритме ФА1/ФА2 было получено значение прогностической ценности положительного результата *PPV* - 44%, свидетельствующее о том, что при получении положительного результата теста обследуемый может являться как больным, так и здоровым с практически равной вероятностью. В тоже время наблюдается 100% прогностическая ценность отрицательного результата - шанс того, что пациент, имеющий отрицательный результат болен, составит лишь 1 из 10000. Таким образом, при биохимическом скрининге фенилкетонурии с



использованием двукратного определения уровня фенилаланина сохраняется большая вероятность получения ложноположительных результатов (56%).

### **3.3 Оценка диагностической информативности лабораторных тестов, используемых для скрининга галактоземии в рамках стандартного алгоритма**

Галактоземия – наследственное нарушение обмена углеводов, при котором в организме накапливается избыток галактозы и ее метаболитов (галактозо-1-фосфата и галактитола), что обуславливает клиническую картину заболевания и формирование отсроченных осложнений. Галактоземия объединяет несколько генетически гетерогенных форм, наиболее тяжелой из которых является классическая галактоземия, возникающая в результате мутаций в гене GALT и, как следствие, дефицита активности фермента галактозо-1-фосфатуридилтрансферазы (ГАЛТ). Поскольку классическая галактоземия является тяжелым смертельным заболеванием, с 2006 года в России проводится биохимический неонатальный скрининг на данное заболевание путем двукратного количественного измерения уровня общей галактозы (ГАО) в сухих пятнах крови новорожденных. Первичное определение уровня общей галактозы (ГАО1) проводится на 4-5-й день жизни у доношенных и на 7-9-й день жизни у недоношенных новорожденных (cut-off - 390 мкмоль/л). В случае получения повышенных значений ГАО1 производится повторный забор крови и повторное определение уровня общей галактозы (ГАО2). В таблице 8 приведены сведения о количестве обследованных детей при проведении неонатального скрининга на галактоземию в г.Санкт-Петербург в 2015-2017 гг.

Результаты неонатального скрининга на галактоземию в г. Санкт-Петербург  
в 2015 – 2017 гг.

Характеристики (абсолютное количество)	2015	2016	2017	Всего
Число обследованных	72462	73631	50124	196217
Положительный ГАО1	494	626	739	1859
Положительный ГАО2	143	189	182	514
Диагностированные случаи классической галактоземии	1	0	1	2
Случаи повышенного уровня общей галактозы в крови без диагноза	14	39	11	64

При расчетах диагностической информативности использовался рекомендованный производителем порог для тестов ГАО1 и ГАО2 - 390 мкмоль/л. Образец, имеющий данные о результатах двух тестов, превышающих принятый порог, считался положительным, в противном случае – отрицательным. Повышение уровня ГАО1 отмечено у 739 из 196217 обследованных новорожденных, по результатам ретеста (ГАО2) положительный результат получен у 514 новорожденных (таблица 9).

Таблица 9

Результаты использования диагностического алгоритма ГАО1/ГАО2 в  
обследованной популяции

Результат алгоритма ГАО1/ГАО2	Заболевание		Всего
	Есть	Нет	
Положительный результат	2	512	514
Отрицательный результат	0	195703	195703
Всего	2	196215	196217

Были определены следующие характеристики диагностической информативности алгоритма ГАО1/ГАО2: 1) чувствительность – 75%; 2) специфичность – 100%; 3) положительная прогностическая ценность – 0,58%; 4) отрицательная прогностическая ценность – 100%; 5) положительное отношение

правдоподобия – 287; 6) отрицательное отношение правдоподобия – 4,0. Распространенность заболевания составила 0,0015 % ( $Prev=0,000015$ ) (табл.10).

Таблица 10

Характеристики информативности лабораторных тестов, используемых для скрининга галактоземии в рамках стандартного алгоритма (ГАО1/ГАО2)

Показатель	Значение	Границы доверительных интервалов			Уровень доверия
		Нижняя	Верхняя	Ширина	
Чувствительность (Se)	0,75	0,29	0,99	0,70	95%
		0,17	1,00	0,83	99%
		0,08	1,00	0,92	99,9%
Специфичность (Sp)	1,0	1,00	1,00	0,00	95%
		1,00	1,00	0,00	99%
		1,00	1,00	0,00	99,9%
Прогностическая ценность положительного результата (PPV)	0,006	0,00	0,01	0,01	95%
		0,00	0,02	0,02	99%
		0,00	0,02	0,02	99,9%
Прогностическая ценность отрицательного результата (NPV)	1,00	1,00	1,00	0,00	95%
		1,00	1,00	0,00	99%
		1,00	1,00	0,00	99,9%
Отношение правдоподобия положительного результата теста LR [+]	287	111	385	273	95%
		65	391	326	99%
		30	397	367	99,9%
Отношение правдоподобия отрицательного результата теста LR [-]	4	1,4	118,7	117,3	95%
		1,2	597,4	596,2	99%
		1,1	5984,7	5983,7	99,9%
Распространенность заболевания (Prev)	0,000015	0,0000032	0,000037	0,000034	95,0%
		0,0000017	0,000047	0,000046	99,0%
		0,0000008	0,000061	0,000060	99,9%

Вычисленные значения характеристик информативности применяемых биохимических методов демонстрируют, что существующий протокол скрининга галактоземии имеет низкие диагностические показатели (чувствительность – 75%, прогностическая ценность положительного результата – 0,58%). С учетом полученного высокого значения специфичности теста ГАО1/ГАО2 ( $Sp=99,74\%$ ),

значительное количество ложноположительных результатов ( $coPPV=99,4\%$ ) может быть связано с низкой распространенностью галактоземии в обследуемой популяции ( $Prev=0,000015$ ).

Таким образом, на основании анализа большого объема данных, отслеженных по неонатальному скринингу с использованием стандартных алгоритмов в течение 3 лет, показана высокая вероятность получения ложноположительных результатов и необходимость применения другой лабораторной технологии на этапе скрининга.

### **3.4. Определение пороговых значений показателей иммунореактивного трипсиногена (ИРТ1, ИРТ2) в точках принятия решений на основе данных неонатального скрининга на муковисцидоз**

Неонатальный скрининг на муковисцидоз в РФ основан на двукратном количественном определении уровня иммунореактивного трипсиногена (ИРТ) в крови новорожденных [17]. Иммунореактивный трипсиноген является проферментом, неактивным предшественником протеолитического фермента трипсина, который вырабатывается в поджелудочной железе и транспортируется в тонкую кишку. В тонкой кишке он активируется, превращается в трипсин ферментом слизистой оболочки кишечника. У детей с муковисцидозом в результате закупорки протоков поджелудочной железы, которые ведут в тонкую кишку, блокируется проникновение трипсиногена в кишечник, что приводит к накоплению белка в крови. Однако, в силу неспецифичности маркера, ИРТ может повышаться у детей при ряде врожденных патологий, таких как: конъюгационная желтуха новорожденных, внутриутробные инфекции продолжительные роды, хромосомные аномалии и так далее [61]. При этом у детей без муковисцидоза уровень ИРТ снижается в течение первого месяца жизни и достигает средних популяционных значений, в то время как у больных сохраняется повышенный уровень этого фермента. На этом факте основана стратегия двукратного определения ИРТ в скрининге: первый тест (ИРТ1) проводится в образце крови, полученном на 3-5 день жизни (7-10 у недоношенных детей), с референтным

пределом 70 нг/мл, а второй (ИРТ2) - на 21-28-й день жизни и cut-off 40 нг/мл. Такой алгоритм скрининга позволяет исключить ложноотрицательные результаты за счет установления cut-off >70 нг/мл (99 перцентиль в общей популяции) при первичном тестировании и минимизировать число ложноположительных результатов путем уменьшения cut-off до 40 нг/мл (99 перцентиль в общей популяции) при ретестировании, с учетом снижения ИРТ, на 3-4 неделе жизни [113]. Указанные значения рекомендованы производителями наборов для определения ИРТ, однако, в силу специфических особенностей, в каждой тестируемой популяции должен быть определен собственный порог. В России до настоящего времени таких исследований для ИРТ не проводилось.

Для проверки гипотезы о различии уровня иммунореактивного трипсиногена у больных муковисцидозом и здоровых детей были проанализированы результаты неонатального скрининга из историй болезни 15 детей, рожденных с 01.01.2013 г. по 01.01.2015 г., с установленным диагнозом «муковисцидоз» и данные скрининга здоровых новорожденных (n=110) без диагноза муковисцидоз, рожденных с 01.01.2015 г. по 01.01.2018 г. В указанных группах был проведен тест сравнения средних значений уровня ИРТ1, по результатам которого получены значимые различия ( $p < 0,05$ ) (таблица 11).

Таблица 11

Уровень иммунореактивного трипсиногена в контрольной группе и группе больных муковисцидозом

Параметры	Больные муковисцидозом ИРТ1_CF (n=15)	Контрольная группа ИРТ1_C (n=110)	P-значение
Среднее:	188	41	-
95% ДИ:	(144,9 230.3)	(38.2 43.8)	-
дисперсия случайной величины	5954,8	215,05	-
различия между средними (с 95% ДИ)	130,53 147 162,64		-
t	18,073		2,0E-36
F	27.691		1.6E-29

С целью определения оптимальных точек отсечения “cut-off” для иммунореактивного трипсиногена (ИРТ1, ИРТ2) в биохимическом скрининге муковисцидоза был проведен ROC-анализ в группе обследуемых детей (n=264), данные об окончательном диагнозе которых были получены из историй болезни.

Из данных ROC-анализа следует, что оптимальной точкой отсечения для ИРТ1 ( $\text{cut-off}_{\text{опт}} = \max(\text{Se}_k + \text{Sp}_k)$ ), обеспечивающей максимум чувствительности и специфичности метода, является точка, соответствующая концентрации ИРТ1=71,5 нг/мл (AUC: 0,991). Рассчитанное нами пороговое значение ИРТ1 соответствует точке отсечения (cut-off ИРТ1=70 нг/мл), используемой в рамках стандартного биохимического алгоритма скрининга на муковисцидоз (рисунок 4).

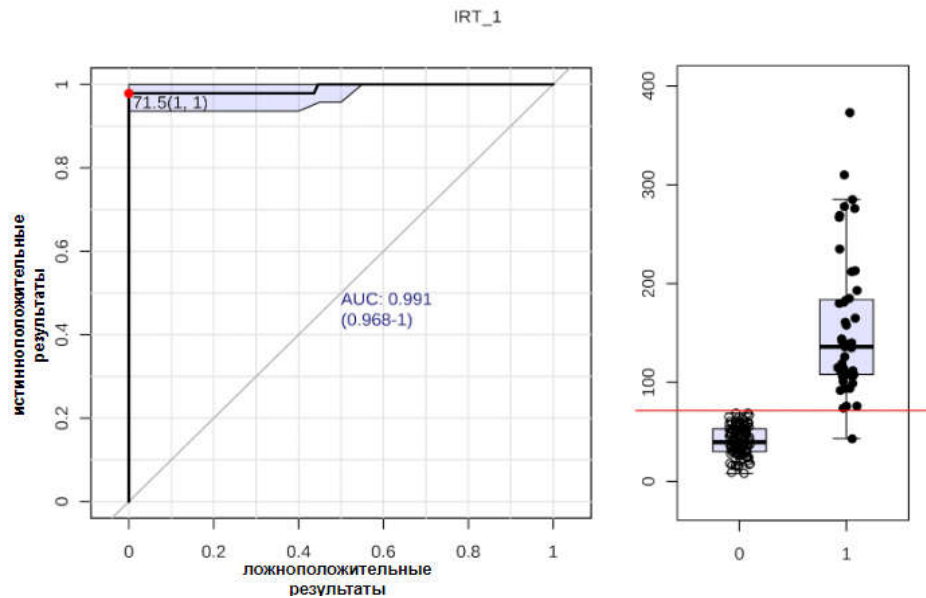


Рисунок 4. ROC-анализ концентрации ИРТ1 в группе больных и обследуемых детей (n=279).

Для ИРТ2 по результатам проведенного ROC-анализа оптимальной точкой отсечения ( $\text{cut-off}_{\text{опт}} = \max(\text{Se}_k + \text{Sp}_k)$ ) является точка, соответствующая концентрации 70,5 нг/мл (AUC: 0,959) (рисунок 5).

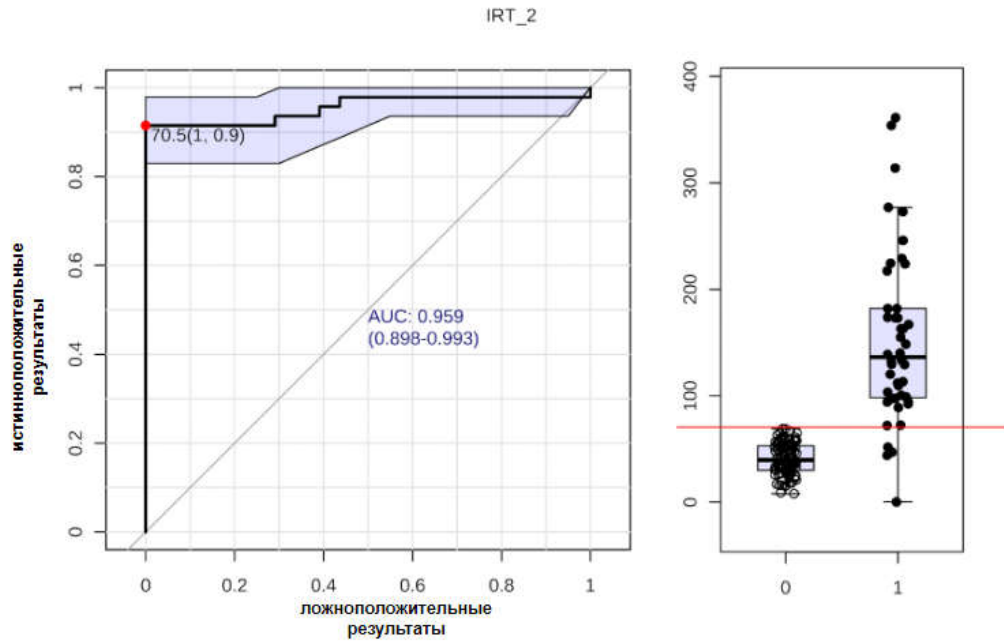


Рисунок 5. ROC-анализ концентрации ИРТ2 в группе больных и обследуемых детей (n=279).

Полученное значение для ИРТ2 существенно выше рекомендованного в настоящее время значения cut-off, равного 40 нг/мл, и практически соответствует значению cut-off для ИРТ1 (70 нг/мл).

Ввиду того, что уровень ИРТ и, соответственно, пороговое значение cutt-off зависит от возраста ребенка, был проведен анализ сроков забора крови для измерения ИРТ2 в группе обследуемых детей (n=264). В результате проведенного анализа было обнаружено, что у 208 (78,78%) из 264 обследуемых новорожденных забор крови для проведения ретеста ИРТ2 осуществлялся до 21-го дня жизни и только у 56 (21,22%) - кровь взята в срок с 21 по 28 день жизни (рисунок 6).



Рисунок 6. Анализ сроков взятия крови для проведения ре-теста ИРТ (ИРТ2) у детей с повышенным уровнем ИРТ при первичном тестировании в рамках неонатального скрининга.

Таким образом, из-за несоблюдения правильных сроков взятия крови рассчитанное значение cut-off для ретеста ИРТ2 не может применяться в существующем алгоритме биохимического скрининга на муковисцидоз. Нарушение преаналитического этапа при проведении ретеста ИРТ2 способствуют увеличению ложноположительных результатов скрининга на муковисцидоз.

### **3.5 Разработка алгоритма неонатального скрининга с включением NGS секвенирования в качестве теста второго уровня**

Важным аспектом работа явилась оценка необходимости проведения подтверждающей диагностики скринируемых заболеваний с помощью молекулярно-генетического тестирования методом NGS-секвенирования ДНК. Был предложен и апробирован следующий алгоритм:

- 1) муковисцидоз: ИРТ1-ИРТ2- NGS секвенирование гена CFTR;
- 2) фенилкетонурия: ФА1-ФА2- NGS секвенирование гена PAH;
- 3) галактоземия: ГАО1-ГАО2- NGS секвенирование гена GALT (рис. 7).



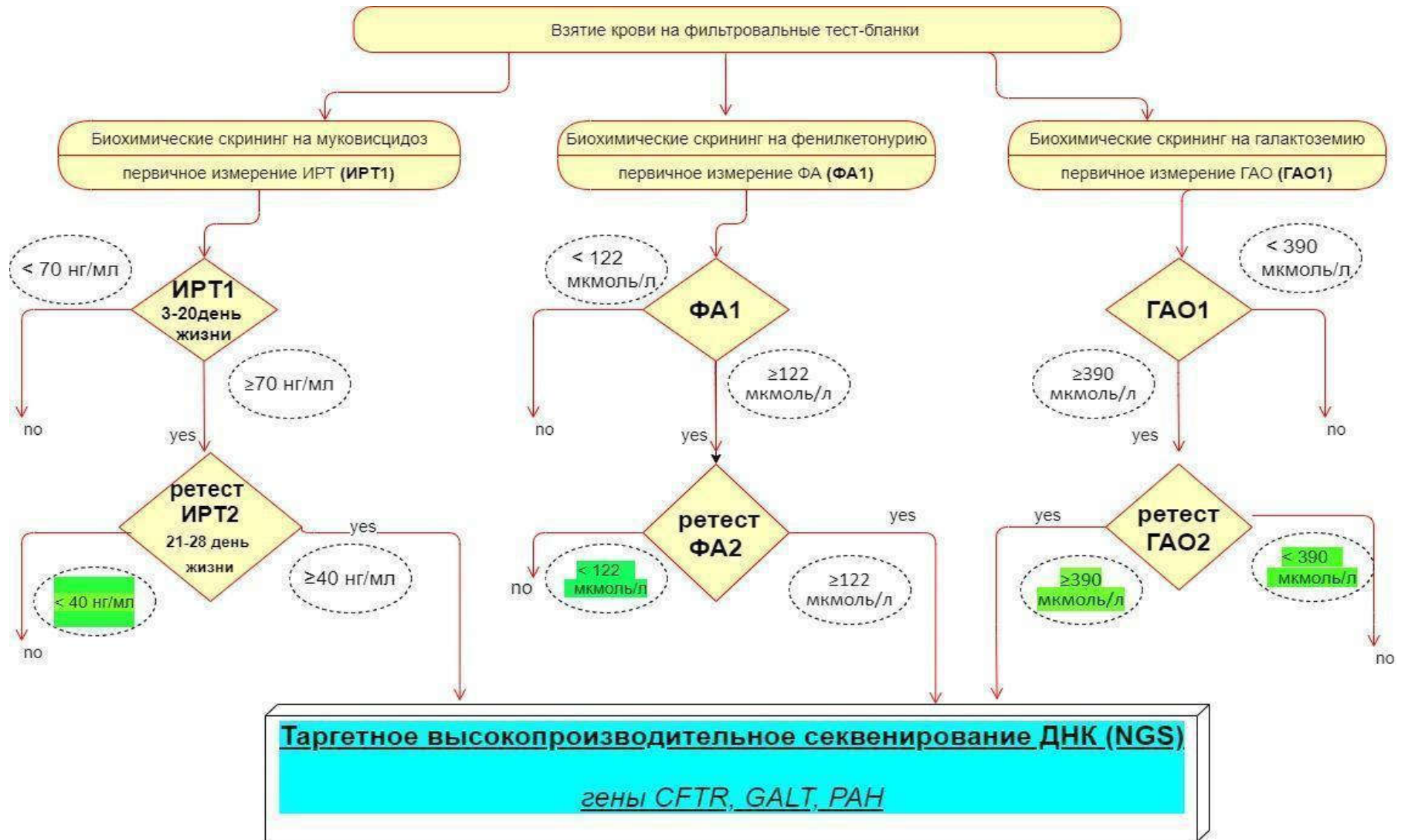


Рисунок 7. Схема предложенного алгоритма неонатального скрининга.

Апробация предложенного комплексного алгоритма неонатального скрининга проведена на 858 из 196217 новорожденных, у которых по результатам биохимического тестирования согласно протоколам ИРТ1/ИРТ2, ФА1/ФА2 и ГАО1/ГАО2 был выявлен повышенный уровень соответствующих маркерных метаболитов: 1) 264 новорожденных с повышенным значением ИРТ2; 2) 80 новорожденных с повышенным значением ФА2; 3) 514 новорожденных с повышенным значением ГАО2. Во всех трех исследуемых группах было проведено таргетное секвенирование генов *CFTR*, *PAH*, *GALT*, патогенные мутации в которых ассоциированы с развитием клинической манифестации муковисцидоза, фенилкетонурии и галактоземии соответственно.

### **3.6. Сравнение эффективности существующего алгоритма неонатального скрининга с предложенным**

Для оценки NGS-метода был принят бинарный критерий: при наличии двух мутаций в исследуемом гене (*CFTR*-муковисцидоз, *PAH*-фенилкетонурия, *GALT*-галактоземия) результат считался положительным, а в любом другом случае – отрицательным. В процессе сравнения использовались данные об окончательном диагнозе обследуемых пациентов, полученных из заключения врача в истории болезни. Положительный результат NGS у пациента с соответствующим подтвержденным диагнозом считался истинно положительным. В случае, если при дальнейшем обследовании диагноз не подтверждался – ложноположительным. Соответственно, отрицательный результат NGS у пациента с неподтвержденным диагнозом считался истинно отрицательным, а отрицательный результат NGS с подтвержденным впоследствии диагнозом был определен как ложноотрицательный.

#### **Результаты исследований в группе с подозрением на муковисцидоз**

ДНК-диагностика методом NGS проведена 264 детям: 263 новорожденным с повышенными результатами скрининга и 1 ребенку с отрицательным результатом скрининга (ИРТ1 = 43 нг/мл) по клинической картине муковисцидоза (мекониальный илеус) (таблица 12).

Результаты использования диагностического алгоритма ИРТ1/ИРТ2/NGS

Результат алгоритма ИРТ1/ИРТ2/NGS	Заболевание		Всего
	Есть	Нет	
Положительный результат	32	0	32
Отрицательный результат	0	232	232
Всего	32	232	264

При проведении генотипирования новорожденных в группе с повышенными значениями ИРТ2 положительный результат, соответствующий наличию двух патогенных мутаций в гене CFTR, получен у 32 пациентов (12%), у которых впоследствии был подтвержден диагноз муковисцидоз. В 262 случаях (88%) по данным NGS получен отрицательный результат, среди которых в 18 случаях (6,8) было обнаружено носительство одной патогенной мутации, а у 214 пациентов патогенных мутаций обнаружено не было. У всех пациентов с отрицательным результатом ДНК-диагностики диагноз муковисцидоз установлен не был (рис.8).

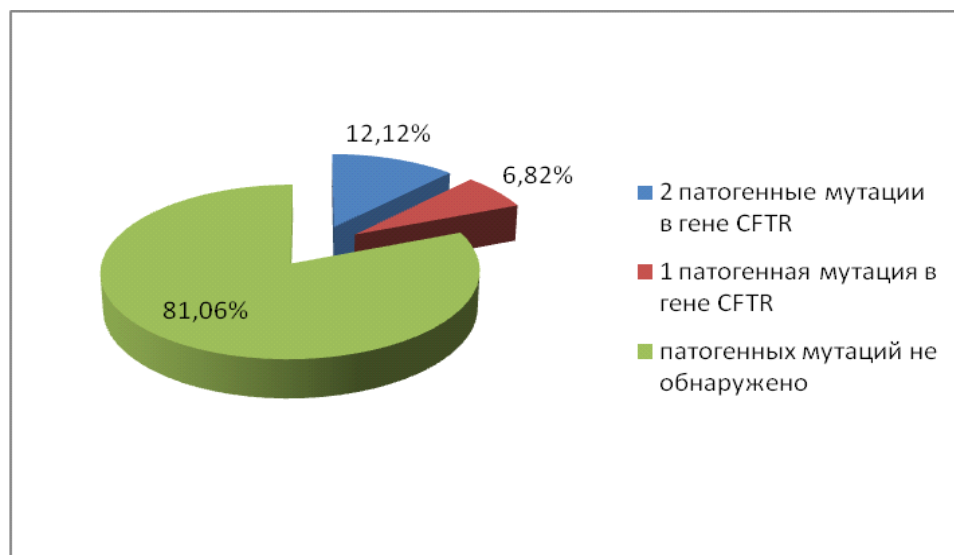


Рисунок 8. Структура обследованных новорожденных с подозрением на муковисцидоз по генотипам.

Для характеристики информативности диагностического метода исследования ИРТ1/ИРТ2/NGS были определены следующие показатели: 1)

чувствительность – 97,0%; 2) специфичность – 100%; 3) положительная прогностическая ценность – 98%; 4) отрицательная прогностическая ценность – 100%; 5) положительное отношение правдоподобия – 227; 6) отрицательное отношение правдоподобия – 33,9 (таблица 13).

Таблица 13

Показатели информативности предложенного диагностического алгоритма  
(ИРТ1/ИРТ2/NGS)

Показатель	Значение	Границы доверительных интервалов			Уровень доверия
		Нижняя	Верхняя	Ширина ДИ	
Чувствительность (Se)	0,97	0,89	1,00	0,10	95%
		0,85	1,00	0,15	99%
		0,79	1,00	0,21	99,9%
Специфичность (Sp)	1,0	0,98	1,00	0,02	95%
		0,98	1,00	0,02	99%
		0,97	1,00	0,03	99,9%
Прогностическая ценность положительного результата (PPV)	0,98	0,89	1,00	0,10	95%
		0,85	1,00	0,15	99%
		0,79	1,00	0,23	99,9%
Прогностическая ценность положительного результата (PPV)	1,00	0,98	1,00	0,02	95%
		0,98	1,00	0,02	99%
		0,97	1,00	0,03	99,9%
Отношение правдоподобия положительного результата теста LR[+]	227,1	61,5	8932,9	8871,4	95%
		42,8	45116,8	45074,1	99%
		29,7	452181,6	452152,0	99,9%
Отношение правдоподобия отрицательного результата теста LR [-]	33,9	9,4	1298,4	1288,9	95%
		6,7	6555,8	6549,1	99%
		4,8	65702,0	65697,2	99,9%

Дополнительно был проведен сравнительный анализ уровня ИРТ среди носителей патогенных аллелей и новорожденных без мутаций для проверки гипотезы о различии уровня ИРТ2 в данных группах. Результаты исследования уровня ИРТ у новорожденных с 2 патогенными мутациями в гене CFTR и носителями 2 аллелей дикого типа в группе с подозрением на муковисцидоз приведены в таблице. Сравнение средних значений ИРТ2 статистически значимых различий не выявило ( $p > 0,05$ ) (таблица 14).

Таблица 14

Сравнительный анализ уровня ИРТ2 у новорожденных с 2 патогенными мутациями и без мутаций

Параметры	Новорожденные с 2 мутациями ИРТ2_P (n=52)	Новорожденные без мутаций ИРТ2_W (n=211)
Среднее:	122	108
95% ДИ:	(101.15 143.36)	(97.76 118.24)
дисперсия случайной величины	5746,6	5692,5
различия между средними	14	
95% ДИ (параметрический)	(-8.767 37.278)	
95% ДИ (бутстрэп)	(-11 36)	
t	1,2193	
p	0,22	
критическое значение t	1,9691	
критерий Уэлча	1,2158	
P	0,23	
Метод Монте-Карло, p	0,23	

Отсутствие значимых различий средних значений иммунореактивного трипсиногена в выборках новорожденных с двумя патогенными мутациями и новорожденных без мутаций свидетельствует о низкой специфичности теста

ИРТ2, что связано с нарушением контрольных сроков забора крови для проведения ре-теста ИРТ2 (рис.6). Это приводит к снижению специфичности биохимического скрининга ИРТ1/ИРТ2 и, соответственно, получению 88% ложноположительных результатов (PPV=12%).

Проведенный статистический анализ показал превосходство основанного на NGS метода над используемым алгоритмом скрининга (таблица 15).

Таблица 15

Сравнительный анализ эффективности алгоритмов ИРТ1/ИРТ2/NGS и ИРТ1/ИРТ2

Показатель	ИРТ1/ИРТ2	ИРТ1/ИРТ2/NGS
Se	0,94	0,97
Sp	0,99	1,000
PPV	0,12	0,97
NPV	1,00	1,00
LR [+]	789	190417
LR [-]	17	34

**Результаты исследований в группе с подозрением на фенилкетонурию**

Для диагностики фенилкетонурии был исследован ген PAH у 80 новорожденных с повышенными результатами неонатального скрининга (ФА 2 □ 122 мкмоль/л).

По результатам секвенирования гена PAH у 32 (40%) из 80 новорожденных обнаружены 2 патогенные мутации, в 48 (60%) случаях получен отрицательный результат (таблица 16).

Таблица 16

Результаты использования диагностического алгоритма ФА1/ФА2/NGS

Результат алгоритма	Заболевание		Всего
	Есть	Нет	
Положительный результат	32	0	32
Отрицательный результат	2	46	48
Всего	34	46	80

У одного ребенка (уровень ФА2 – 1310 мкмоль/л), с установленным диагнозом фенилкетонурия, в связи с ограничениями метода NGS (невозможность

обнаружения крупных делеций/инсерций), выявлена только одна патогенная аллель. Еще у одного ребенка с повышенным неонатальным скринингом (уровень ФА2 – 2326 мкмоль/л) мутаций в гене РАН выявлено не было, что также может быть связано с наличием крупных геномных перестроек, либо с нарушениями обмена тетрагидробиоптерина, обусловленных мутациями в других генах. Таким образом, при проведении генетического тестирования в группе детей с подозрением на фенилкетонурию получено 2 ложноотрицательных результата.

Аналогичным образом определены показатели информативности алгоритма: 1) чувствительность – 92%; 2) специфичность – 98%; 3) положительная прогностическая ценность – 97%; 4) отрицательная прогностическая ценность – 94%; 5) положительное отношение правдоподобия – 44; 6) отрицательное отношение правдоподобия – 11,8 (таблица 17).

Таблица 17

Показатели информативности предложенного диагностического алгоритма  
(ФА1/ФА2/NGS)

Показатель	Значение	Границы доверительных интервалов			Уровень доверия
		Нижняя	Верхняя	Ширина ДИ	
Se	0,92	0,81	0,98	0,17	95%
		0,76	0,99	0,23	99%
		0,70	1,00	0,29	99,9%
Sp	0,98	0,92	1,00	0,07	95%
		0,89	1,00	0,11	99%
		0,85	1,00	0,15	99,9%
PPV	0,97	0,89	1,00	0,10	95%
		0,85	1,00	0,15	99%
		0,79	1,00	0,21	99,9%
NPV	0,94	0,86	0,99	0,13	95%
		0,82	0,99	0,17	99%
		0,78	1,00	0,22	99,9%
LR [+]	44	12,0	1702,3	1690,2	95%
		8,4	8595,7	8587,3	99%
		5,9	86145,7	86139,8	99,9%
LR [-]	11,8	5,1	54,3	49,2	95%
		4,1	99,0	94,9	99%
		3,2	222,8	219,6	99,9%

Сравнительный анализ эффективности существующего и предложенного алгоритмов показал, что метод NGS уступает методу определения фенилаланина по чувствительности - при проведении генетического тестирования в группе детей с подозрением на фенилкетонурию получено 2 ложноотрицательных результата. Это обусловлено ограничениями метода, а также может быть связано с нарушениями обмена тетрагидробиоптерина, обусловленных мутациями в других генах, исследование которых не производилось. При этом в алгоритме, основанном на NGS, значение положительной прогностической ценности составило 97%, что значительно снижает количество ложноположительных результатов до 3% (таблица 18).

Таблица 18

Сравнительный анализ эффективности алгоритмов ФА1/ФА2/NGS и ФА1/ФА2

Показатель	ФА1/ФА2	ФА1/ФА2/NGS
Se	0,97	0,92
Sp	1,0	0,98
PPV	0,44	0,97
NPV	1,0	0,94
LR [+]	4150	44
LR [-]	37	12

Для оценки клинической информативности теста количественного определения ФА был проведен сравнительный анализ уровня ФА среди носителей двух патогенных аллелей и новорожденных без мутаций (таблица 19).



Уровень фенилаланина у новорожденных с 2 патогенными мутациями и без мутаций

Параметры	Новорожденные с 2 мутациями ФА2_Р (n=37)	Новорожденные без мутаций ФА2_В (n=43)
Среднее:	917	223
95% ДИ:	(708.61 1126)	(118.83 326.39)
дисперсия случайной величины	3,92E+05	1,14E+05
различия между средними	695	
95% ДИ (параметрический)	(475.07 914.36)	
95% ДИ (бутстрэп)	(478 921)	
t	6,2967	
p	1,7E-08	
критическое значение t	1,9908	
критерий Уэлча	6,0387	
p	1,5E-07	
Метод Монте-Карло, p	1,0E-07	

Результат показал наличие статистически значимых различий ( $p < 0,05$ ), что свидетельствует о высокой специфичности фенилаланина, как маркера фенилкетонурии. Однако биохимическое определение уровня фенилаланина не позволяет проводить дифференциальную диагностику классической фенилкетонурии, требующей незамедлительного начала лечения, и легких форм гиперфенилаланинемии.

#### **Результаты исследований в группе с подозрением на галактоземию**

Исследование гена GALT проводилось в группе 514 новорожденных с подозрением на галактоземию. По результатам ДНК-теста у 2 (0,4%) пациентов установлен генотип с двумя патогенными мутациями, приводящими к развитию классической галактоземии, в 512 (99,6%) случаях получен отрицательный результат (таблица 20).

## Результаты использования диагностического алгоритма ГАО1/ГАО2/NGS

Результат теста	Заболевание		Всего
	Есть	Нет	
Положительный результат	2	0	2
Отрицательный результат	0	512	512
Всего	2	512	514

Определение информативности диагностического метода ГАО1/ГАО2 / NGS: 1) чувствительность – 75,0%; 2) специфичность – 100%; 3) прогностическая ценность положительного результата ( $PPV = 75\%$ ); 4) прогностическая ценность отрицательного результата – 100%; 5) отношение правдоподобия положительных результатов теста: 385,5 6) отношение правдоподобия отрицательных результатов теста: 4,0 (таблица 21).

Таблица 21

## Показатели информативности предложенного диагностического алгоритма ГАО1/ГАО2/NGS

Показатель	Значение	Границы доверительных интервалов			Уровень доверия
		Нижняя	Верхняя	Ширина	
Se	0,75	0,29	0,99	0,70	95%
		0,17	1,00	0,83	99%
		0,08	1,00	0,92	99,9%
Sp	1,0	0,99	1,00	0,01	95%
		0,99	1,00	0,01	99%
		0,99	1,00	0,01	99,9%
PPV	0,75	0,29	0,99	0,70	95%
		0,17	0,99	0,83	99%
		0,08	1,00	0,92	99,9%
NPV	1,00	0,99	1,00	0,01	95%
		0,99	1,00	0,01	99%
		0,98	1,00	0,01	99,9%
LR [+]	385,5	75,35	15217,6	15142,3	95%
		40,68	76779,0	76738,4	99%
		18,99	769329,3	769310,4	99,9%
LR [-]	4,0	1,41	118,76	117,4	95%
		1,20	597,83	596,6	99%
		1,10	5987,33	5986,2	99,9%

При сравнении вычисленных значений показателей информативности диагностических методов было показано, что существующий протокол диагностики галактоземии при условии положительного результата имеет низкие диагностические показатели (таблица 22).

Таблица 22

Сравнительный анализ эффективности алгоритмов ГАО1/ГАО2/NGS и ГАО1/ГАО2

<b>Показатель</b>	<b>ГАО1/ГАО2</b>	<b>ГАО1/ГАО2/NGS</b>
Se	0,75	0,75
Sp	1,00	1,00
PPV	0,006	0,75
NPV	1,00	1,00
LR [+]	289	385
LR [-]	4	4

Применение ДНК-диагностики в качестве подтверждающей диагностики позволяет минимизировать количество ложных срабатываний теста ГАО2.

Таким образом, проведенный статистический анализ показал превосходство основанного на NGS алгоритма над стандартным алгоритмом неонатального скрининга муковисцидоза, фенилкетонурии и галактоземии за счет достижения высоких значений прогностической ценности положительных результатов и существенного снижения количества ложноположительных результатов (таблица 23).

Сравнительный анализ эффективности стандартного и предложенного алгоритмов неонатального скрининга моногенных наследственных заболеваний

Показатель	ИРТ1/ИРТ2	ИРТ1/ИРТ2/ NGS	ФА1/ ФА2	ФА1/ФА2/ NGS	ГАО1/ ГАО2	ГАО1/ГАО2 /NGS
Se	0,94	0,97	0,97	0,92	0,75	0,75
Sp	0,99	1,00	1,0	0,98	1,00	1,00
PPV	0,12	0,98	0,44	0,97	0,006	0,75
NPV	1,00	1,00	1,0	0,94	1,00	1,00
LR[+]	789	227,1	4150	44	289	385
LR[-]	17	0,97	37	12	4	4

### 3.7 Спектр выявленных генетических вариантов, обуславливающих развитие “мягких” форм моногенных наследственных заболеваний

#### *Спектр идентифицированных мутаций в гене CFTR.*

Среди 32 пациентов с положительным результатом при проведении генотипирования методом NGS в 11 случаях (34%) присутствовала хотя бы одна редкая мутация, не входящая в основные российские панели для исследования частых мутаций. Наиболее частая мутация в Кавказской популяции F508del обнаружена в гомозиготном или компаунд-гетерозиготном состоянии в 41 аллели (64,06%) из 64, второй по частоте явилась мутация CFTRdele2,2(21kb) – в компаунд-гетерозиготном состоянии в 5 генотипах (7,81%), третьей – 2143delT – у 4 новорожденных (6,25%) в компаунд-гетерозиготном состоянии. В остальных 14 аллелях представлены редкие мутации, большая часть которых обуславливает развитие легких форм муковисцидоза (таблица 24).

Генотипы обследованных новорожденных на муковисцидоз с двумя патогенными мутациями в гене CFTR

Генотип	Количество новорожденных
F508del/F508del	13
F508del/CFTRdele2,3 (21kb)	4
F508del/2143delT	2
3120+1G>A/3120+1G>A	1
CFTRdele2,3 (21kb)/Q98R	1
F508del/1811+1.6kbA>G	1
R1066C/ F508del	1
2143delT/K598X	1
F508del/W1282X	1
R792X/ F508del	1
F508del/R117H	1
F508del/2184insA	1
R334W/2143delT	1
1259insA/1259insA	1
F508del/2721del11	1

У 18 пациентов с одной патогенной мутацией в генотипе обнаружено 3 аллели (16,67%) с мутацией F508del, 2 аллели (11,11%) с мутацией CFTRdele2,3(12kb), в 13 аллелях обнаружены редкие мутации (p.S1196X, p.359insT, p.574delA, p.3821delT, p.S1253R, p.E217G, p.IVS19-24G>A, p.F1052V, p.W1282R).

Полученные результаты демонстрируют широкое генетическое разнообразие обследованной популяции, анализ всей кодирующей последовательности гена CFTR методом NGS секвенирования позволяет выявлять редкие генетические варианты.

*Спектр идентифицированных мутаций в гене PAH.*

Из 32 новорожденных с двумя патогенными мутациями у 21 ребенка (65,6%) обнаружены патогенные аллели, характерные для классической фенилкетонурии (уровень фенилаланина >1200 мкмоль/л), а у 11 (34,4%) выявлены мутации, обуславливающие развитие легкой гиперфенилаланинемии (уровень фенилаланина 153-459 мкмоль/л).

В группе обследованных, как и в большинстве европейских популяций, самой распространенной мутаций явилась R408W, которая была обнаружена в 44 из 64 идентифицированных патогенных аллелей (68,75%). В группе новорожденных с диагнозом фенилкетонурии данная аллель встретилась у 22 из 23 новорожденных (95,65%), из них в гомозиготном состоянии – у 15 (65,2%), у 6 (26,1%) – в компаунд-гетерозиготном состоянии с другими мутациями (IVS10-11G>A, R261X, R252W, IVS12+1G>A) и у 1 пациента (4,35%) в гетерозиготном состоянии (таблица 25).

Таблица 25

Генотипы обследованных новорожденных с диагнозом классической фенилкетонурии

Генотип	Диагноз	Количество
R408W/R408W	ФКУ	15
R408W/IVS10-11G>A	ФКУ	2
R408W/R252W	ФКУ	2
R408W/R261X	ФКУ	1
R408W/IVS12+1G>A	ФКУ	1
R408W/n	ФКУ	1
n/n	ФКУ	1

Среди 11 новорожденных с диагнозом гиперфенилаланинемии из 22 патогенных аллелей в 5 выявлена мутация p.R408W (22,7%), а остальные 17 (77,2%) были представлены редкими мутациями, идентификация которых возможна только при расширенном тестировании гена PAH (рисунок 9).

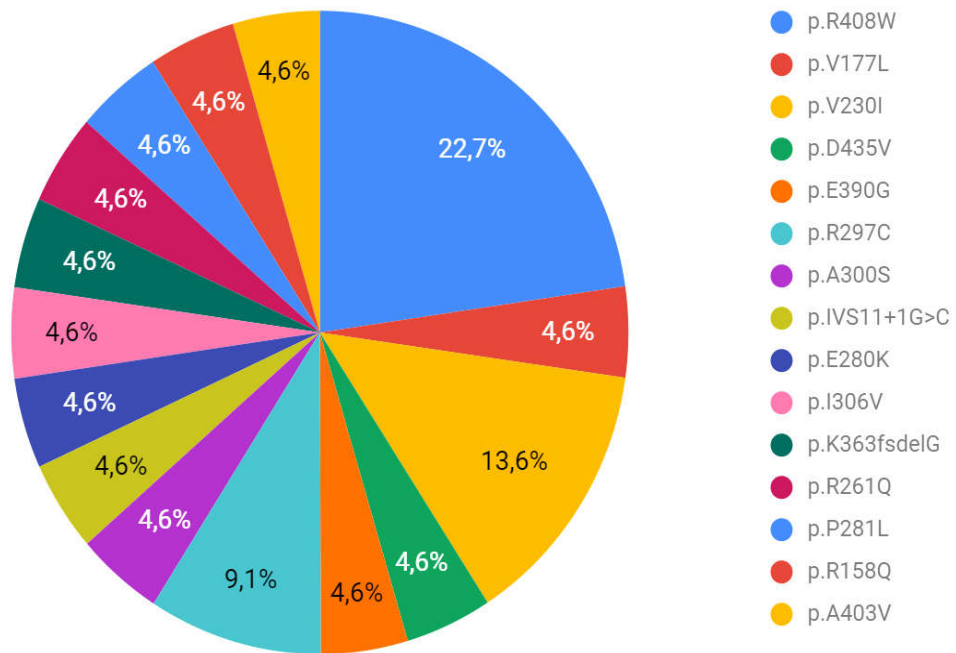


Рисунок 9. Генотипы обследованных новорожденных с диагнозом гиперфенилаланиемии.

Применение алгоритма ФА1/ФА2/NGS в неонатальном скрининге на фенилкетонурию позволяет выявлять мутации различного функционального типа, в том числе и «мягкие» генотипы, обуславливающие развитие легкой гиперфенилаланиемии, при которых пациентам не требуется назначение лечебного питания.

*Спектр идентифицированных мутаций в гене GALT.*

При анализе гена GALT в группе новорожденных с повышенным уровнем ГАО2 (514) патогенные мутации выявлены в 164 аллелях: у 67 пациентов (134 аллели) обнаружены две патогенные мутации и у 30 пациентов установлен статус носительства (30 аллелей).

Из 67 генотипов, содержащих две патогенные аллели, в 2 (3%) выявлены патогенные мутации, характерные для классической галактоземии (G/G); в 30 (44,8%) - обнаружены мутации галактоземии Дуарте и классической галактоземии в компаунд-гетерозиготном состоянии (G/N); в 35 (52,2%) - мутации варианта Дуарте в гомозиготном состоянии (D/D) (рисунок 10).

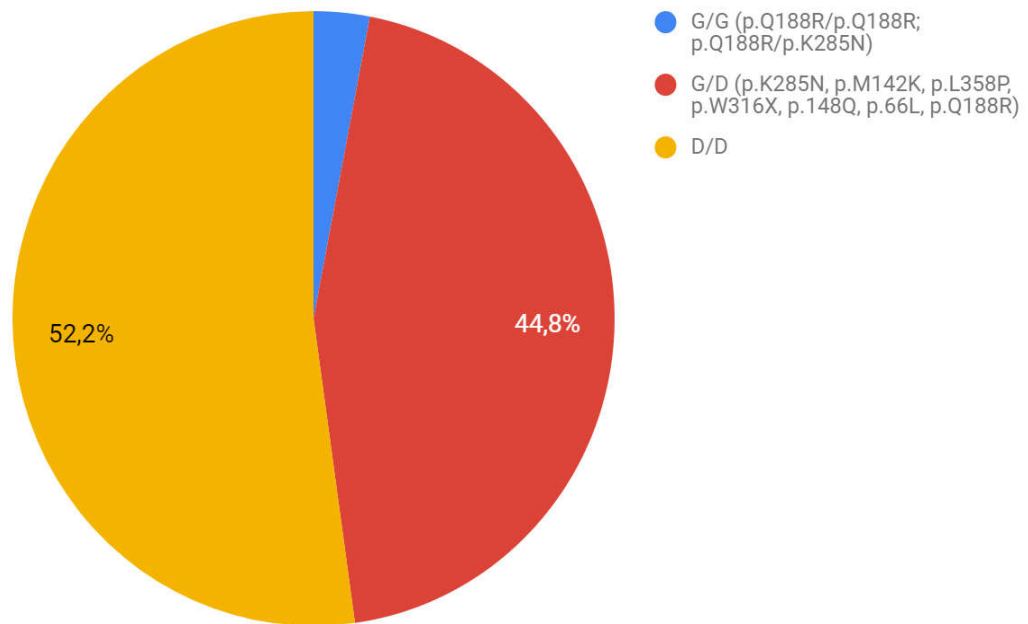


Рисунок 10. Генотипы новорожденных, обследованных на галактоземию, с двумя патогенными мутациями в гене GALT (n=67).

Самой распространенной мутацией, характерной для классической галактоземии, в европейской популяции является p.Q188R. В нашем исследовании данная мутация также явилась самой частой и идентифицирована в 32 (51,6%) генотипах из 62: у обоих пациентов (100%) с генотипом G/G, у 13 новорожденных (43,3%) с генотипом G/D и в 19 случаях (63,3%) гетерозиготного носительства патогенной мутации (G/N). Данные о частоте встречаемости мутации p.Q188R в выборке новорожденных, обследованных на галактоземию, представлены на рисунке 11.



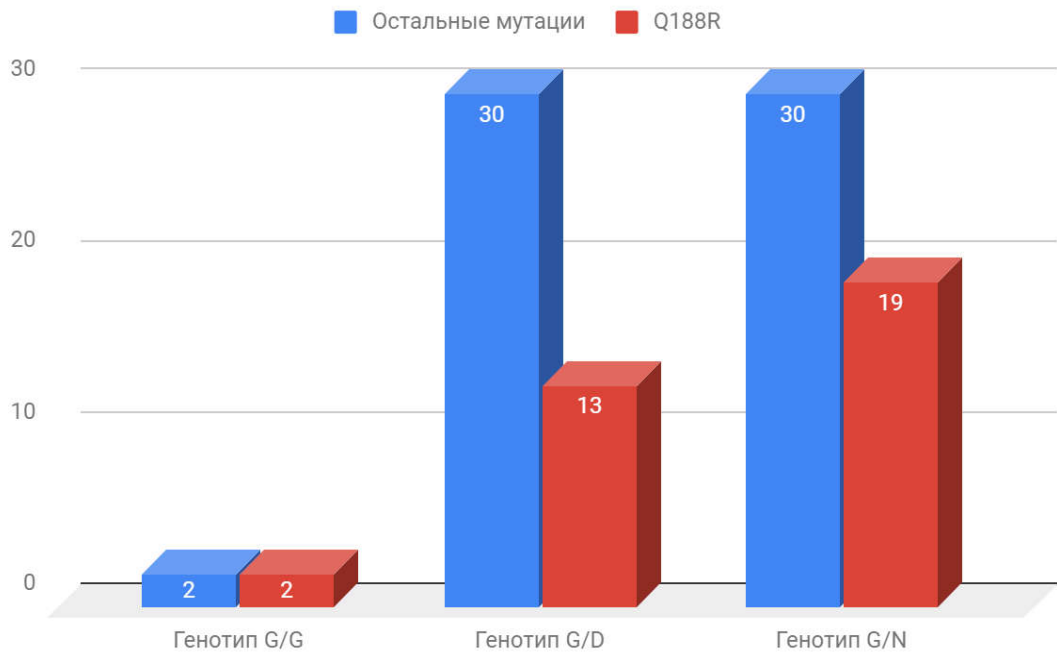


Рисунок 11. Частота встречаемости мутации p.Q188R в выборке новорожденных с мутациями, характерными для классической галактоземии (n=62).

Второй по частоте встречаемости в нашем исследовании явилась мутация p.K285N, которая обнаружена у 11 (17,7%) из 62 новорожденных с аллелями, содержащими мутации классической галактоземии. В остальных генотипах обнаружены более редкие генетические варианты в гене GALT: p.M142K, p.IVS3-2A>G, p.L358P, p.P66L, p.D28N, p.W316X, p.R148Q (рисунок 12).

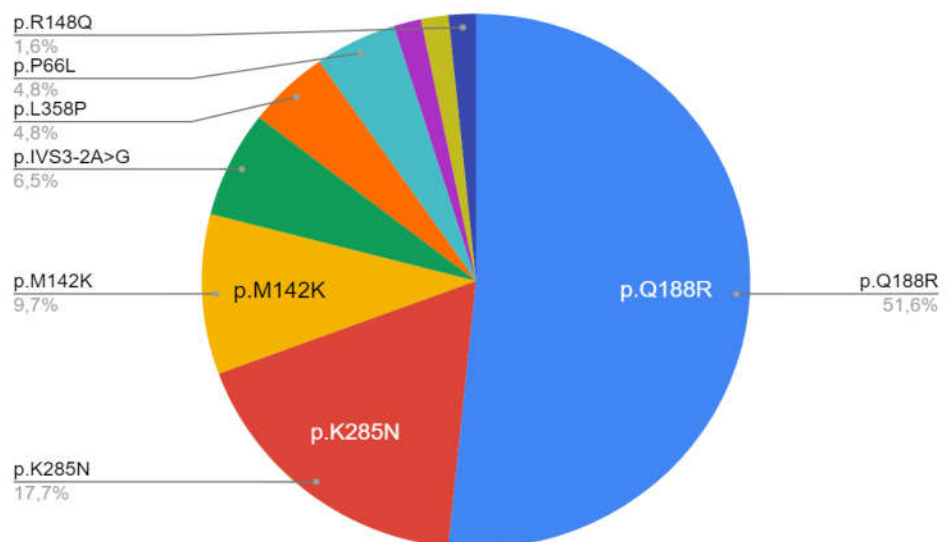


Рисунок 12. Спектр и частота встречаемости мутаций новорожденных с мутациями, характерными для классической галактоземии G/N (n=62).

Спектр обнаруженных мутаций в выборке новорожденных с повышенным уровнем общей галактозы, наряду с наиболее частыми мутациями (p.Q188R, p.K285N, p.M142K), включает редкие генетические варианты (21%), не входящие в российские диагностические панели.

Таким образом, с использованием NGS-секвенирования гена GALT удалось подтвердить диагноз классической галактоземии лишь у 2 (0,4%) новорожденных из 514 с повышенным уровнем общей галактозы. В 18 % случаев (95 новорожденных из 514) повышение уровня общей галактозы в крови связано с гетерозиготным носительством мутантных аллелей гена GALT, а также аллелей, характерных для биохимической формы галактоземии Дуарте. Доброкачественные варианты галактоземии (варианты Дуарте) приводят к повышению уровня общей галактозы в крови новорожденных, определение которых позволяет исключить тяжелые формы галактоземии. В 80% случаев (417 из 514) ложноположительные результаты, получены в результате неспецифичности биохимического маркера галактоземии. Это подчеркивает необходимость проведения молекулярно-генетической диагностики для подтверждающей диагностики неонатального скрининга галактоземии.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Подводя итоги проведенного диссертационного исследования, следует остановиться на следующих положениях.

Программы массового обследования новорожденных проводятся с целью ранней диагностики определенных наследственных заболеваний. Эффективные массовые скрининговые программы должны быстро выявлять максимальное количество лиц, подверженных риску заболевания, с исключительной чувствительностью, высокой специфичностью и минимальным мануальным вмешательством. Биохимические тесты, составляющие основу массового обследования новорожденных в России, достигают 99,0% чувствительности и

99,8% специфичности. Тем не менее, для некоторых заболеваний эти тесты имеют низкую положительную прогностическую ценность и обуславливают высокий процент ложноположительных результатов. Несмотря на постоянное совершенствование лабораторных технологий, которые оптимизируют и повышают диагностическую эффективность, в настоящее время остается проблема ложноположительных и неоднозначных результатов неонатального скрининга. Указанная проблема вызвана, в первую очередь, отсутствием протоколов подтверждающей диагностики моногенных заболеваний при проведении неонатального скрининга. Значительные диагностические трудности при проведении массового скрининга связаны с недостаточной специфичностью алгоритмов, основанных на использовании только биохимических тестов. Кроме того, гетерозиготное носительство мутаций аутосомно-рецессивных моногенных заболеваний у здоровых лиц также приводит к повышению биохимических метаболитов. При этом расширение массового скрининга неизбежно приводит к увеличению доли ложноположительных результатов, обуславливая значительные экономические затраты и увеличивая психологическое бремя родителей.

При получении положительных результатов скрининга врачи сталкиваются с ситуациями, когда клинически ребенок здоров, однако повышенные метаболиты требуют тщательного наблюдения и проведения дополнительных диагностических методов. Для решения этой проблемы в некоторых странах мира были разработаны алгоритмы скрининга с включением методов ДНК-диагностики, в которых учитывались географические особенности распространенности различных заболеваний, а также спектр и частота мутаций.

Геномное секвенирование, широко используемое в настоящее время для диагностики редких заболеваний, рекомендовано почти для всех тяжелобольных детей в отделениях интенсивной терапии и предложено для массового скрининга новорожденных с целью персонализации медицинской помощи. При этом об исследованиях в популяционном масштабе для установления характеристик эффективности секвенирования для неонатального скрининга не сообщалось. Массовое обследование на наследственные болезни обмена представляет собой

идеальную модель для оценки роли секвенирования в скрининге населения, поскольку большинство из них представляют собой моногенные менделевские расстройства, влияющие на хорошо изученные биохимические пути. Кроме того, чувствительность и специфичность обнаружения наследственных болезней обмена на основе секвенирования можно напрямую сравнить с чувствительностью и специфичностью текущего биохимического скрининга. Исследование генома для выявления болезней обмена, уже включенных в неонатальный скрининг, может свидетельствовать о его потенциальной полезности для включения других излечимых расстройств, не поддающихся обнаружению с помощью масс-спектрометрических методов.

В России протоколы подтверждающей диагностики не регламентированы и отличаются в разных регионах. Вследствие этого была поставлена цель настоящего исследования – разработать и научно обосновать алгоритм неонатального скрининга моногенных наследственных болезней обмена с использованием технологии высокопроизводительного секвенирования. В связи с тем, что в гене, ответственном за развитие адреногенитального синдрома, присутствует псевдоген, затрудняющий ДНК-диагностику, а врожденный гипотиреоз в большинстве случаев не является наследственным заболеванием, в исследование были включены 3 моногенных заболевания: муковисцидоз, фенилкетонурия, галактоземия. Были определены аналитическая точность и клиническая польза рутинного применения метода высокопроизводительного секвенирования ДНК с использованием таргетной панели для трех заболеваний в массовом обследовании новорожденных. Благодаря анализу всех кодирующих областей генов P4H и CFTR, выявлены больные муковисцидозом с «мягкими» генотипами, включающими редкие мутации и больные с гиперфенилаланинемией, не требующие назначения лечебного питания. Исследование всего гена GALT показало влияние гетерозиготного носительства мутантных аллелей и аллелей биохимической формы галактоземии Дуарте на уровень общей галактозы в крови у новорожденных. Анализ последовательности генов методом высокопроизводительного секвенирования с использованием небольших

таргетных панелей за счет высокой пропускной способности доказывает свою эффективность в контексте применения в скрининговых программах. Секвенирование всего гена открывает возможности для выявления мутаций, приводящих как к классическим, так и к атипичным фенотипам заболеваний, что позволяет подтвердить диагноз заболевания до его клинической манифестации. Небольшое количество положительных результатов скрининга на наследственные болезни обмена предполагает, что секвенирование может стать достаточно экономичным и быстрым для получения эффективной информации в качестве подтверждающего теста после получения положительного результата биохимического скрининга. Отсутствие необходимости повторного забора крови у новорожденных с повышенными результатами ре-теста, а также сокращение сроков постановки диагноза благодаря NGS, является важным фактором, снижающим психологический стресс родителей.

Таким образом, применение секвенирования следующего поколения в программе массового обследования новорожденных в России оптимально для подтверждающей диагностики моногенных наследственных болезней обмена.

## **ВЫВОДЫ**

1. Используемые биохимические тесты для скрининга фенилкетонурии, муковисцидоза и галактоземии имеют высокие показатели чувствительности и специфичности, обеспечивающие отсутствие ложноотрицательных результатов при массовом обследовании новорожденных.

2. Низкая распространенность указанных заболеваний в популяции приводит к получению неудовлетворительных значений положительной прогностической ценности скрининговых биохимических тестов, что обуславливает высокий процент ложноположительных результатов: 88% при скрининге муковисцидоза; 56% - фенилкетонурии и 99% - галактоземии.

3. Оптимальная точка отсечения концентрации иммунореактивного трипсиногена при проведении первичного тестирования на муковисцидоз

соответствует пороговому значению, предусмотренному стандартным протоколом. Фактором, существенно изменяющим результаты повторного тестирования и снижающим диагностическую ценность скрининга в целом, является нарушение контрольных сроков забора крови для проведения ретеста.

4. Включение таргетного геномного высокопроизводительного секвенирования NGS в стандартный алгоритм неонатального скрининга на муковисцидоз, фенилкетонурию и галактоземию в качестве теста второго уровня позволяет достичь 97% прогностической ценности положительных результатов, что существенно повышает эффективность диагностики моногенных наследственных болезней обмена.

5. Использование высокопроизводительного секвенирования для анализа всей последовательности генов CFTR и PAH в неонатальном скрининге позволяет идентифицировать генотипы, обуславливающие развитие более легких форм заболеваний, которые представляют особые трудности для диагностики муковисцидоза и фенилкетонурии.

6. Гетерозиготное носительство мутантных аллелей и аллелей биохимической формы галактоземии Дуарте в сочетании с низкой распространенностью классической галактоземии в популяции обуславливает получение более 90 % ложноположительных результатов биохимического скрининга.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. С целью своевременного выявления больных детей на досимптоматическом этапе необходимо внедрение в учреждения практического здравоохранения, осуществляющих массовое обследование новорожденных, современных методов ДНК-диагностики в качестве подтверждающего этапа скрининга.

2. Для снижения количества ложноположительных результатов биохимического скрининга муковисцидоза необходимо проведение

организационных мероприятий с детскими лечебно-профилактическими учреждениями по соблюдению сроков забора крови для ретеста ИРТ.

3. Учитывая тот факт, что существующий протокол диагностики галактоземии при условии положительного результата имеет низкие диагностические показатели, необходим пересмотр пороговых значений теста ГАО.

4. Полученные данные генотипирования у носителей патогенных аллелей в генах PAH, CFTR и GALT, рекомендованы для использования при медико-генетическом консультировании семей для будущего потомства.

### **ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ**

Последующее развитие темы исследования связано с разработкой и апробацией панели для секвенирования трех групп наследственных болезней обмена: аминокислотопатий, органических ацидурий и дефектов митохондриального  $\beta$ -окисления жирных кислот, с целью подтверждающей диагностики проводимого селективного скрининга новорожденных указанных заболеваний. В дальнейшем научно-обоснованные уточнения применения NGS в диагностике болезней обмена необходимо выполнить для других нозологий, включенных в Приказ Министерства здравоохранения РФ от 21 апреля 2022 г. № 274н "Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи пациентам с врожденными и (или) наследственными заболеваниями".

### **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

АГС – адреногенитальный синдром

ГАО – общая галактоза

ИРТ – иммунореактивный трипсиноген

НБО – наследственные болезни обмена

НС – неонатальный скрининг

ФА – фенилаланин

AUC – площадь под ROC-кривой

LR [+] – отношение правдоподобий для позитивов

LR [-] – отношение правдоподобий для негативов



NGS (от англ. «next generation sequencing») – высокопроизводительное секвенирование ДНК

NPV – предсказательность негативов

PPV – предсказательность позитивов

Se – чувствительность

Sp – специфичность

TAT (от англ. «turn-around time») – время оборота теста

TNGS (от англ. «targeted next generation sequencing») – таргетное высокопроизводительное секвенирование ДНК

WES (от англ. «whole exome sequencing») – полноэкзомное секвенирование ДНК

WGS (от англ. «whole genome sequencing») – полногеномное секвенирование ДНК.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Амелина, М.А. Частота и отягощенность ФКУ у детского населения Ростовской области – Текст: электронный / М.А. Амелина, С.С. Амелина, Р.А. Зинченко, [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – № 4. – URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=24946>. – Дата публикации: 13.07.2016.
2. Бадалян, Л.О. Наследственные болезни у детей: монография / Л.О. Бадалян, В.А. Таболин, Ю.Е. Вельтищев. – Москва: Медицина, 1971. – 367 с.
3. Баранов, А.А. Нарушения обмена галактозы (Галактоземия). Клинические рекомендации – Текст: электронный / А.А. Баранов, Г.В. Байдакова,

Т.Э. Боровик, Т.В. Бушуева, [и др.] // Рубрикатор клинических рекомендаций – URL: [https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/375\\_2](https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/375_2). – Дата публикации: 30.08.2021.

4. Барашнев, Ю.И. Диагностика и лечение врожденных и наследственных заболеваний у детей (путеводитель по клинической генетике) / Ю.И. Барашнев, В.А. Бахарев, П.В. Новиков. – Москва: Триада-Х, 2004. – 560 с.

5. Бушуева, Т.В. Оценка качества жизни детей, больных фенилкетонурией / Т.В. Бушуева, И.В. Винярская, В. Черников, [и др.] // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2014. – Т.69, № 11-12. – С. 39–45.

6. Бушуева, Т.В. Современный взгляд на проблему фенилкетонурии у детей: диагностика, клиника, лечение / Т.В. Бушуева // Вопросы современной педиатрии. – 2010. – Т.9, №1. – С. 157–160.

7. Волгина, С.Я. Фенилкетонурия у детей: современные аспекты патогенеза, клинических проявлений, лечения / С.Я. Волгина, С.Ш. Яфарова, Г.Р. Клетенкова // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2017. – Т.62, №5. – С. 111–118.

8. Воскобоева, Е.Ю. Галактоземия в России: молекулярно-генетические особенности, неонатальный скрининг, подтверждающая диагностика / Е.Ю. Воскобоева, Г.В. Байдакова, А.И. Денисенков, [и др.] // Медицинская генетика. – 2009. – Т.8, № 6. – С.25–33.

9. Дедов, И.И. Скрининг на врожденный гипотиреоз в Российской Федерации / И.И. Дедов, О.Б. Безлепкина, Т.А. Вадина, [и др.] // Проблемы Эндокринологии. – 2018. – Т.64, №1. – С. 14–20.

10. Дерябина, С.С. Неонатальный скрининг: этические вопросы расширения спектра скринируемых заболеваний / С.С. Дерябина // Вопросы современной педиатрии. – 2015. – Т.14, №6. – С. 714–723.

11. Драпкина, О.М. Скрининг: терминология, принципы и международный опыт / О.М. Драпкина, И.В. Самородская // Профилактическая медицина. – 2017. – Т.22, №1. – С. 90–97.

12. 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.
13. Зыков, В.П. Диагностика и лечение болезней нервной системы у детей / В.П. Зыков. – Москва: Триада-Х, 2013. – 432 с.
14. Ижевская, В.Л. Информированное согласие при генетическом тестировании и скрининге / В.Л. Ижевская, Е.Е. Баранова // Медицинская генетика. – 2022. –Т.21, № 4. – С.16–24.
15. Иллариошкин, С.Н. Проблемы ранней диагностики наследственных заболеваний нервной системы / С.Н. Иллариошкин, Ю.А. Селиверстов, С.А. Ключников // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2021. – Т.66, №4. – С. 8–15.
16. Карева, М.А. Федеральные клинические рекомендации - протоколы по ведению пациентов с врожденной дисфункцией коры надпочечников в детском возрасте / М.А. Карева, И.С. Чугунов // Проблемы эндокринологии. – 2014. –Т.60, №2. – С. 42–50.
17. Клинические рекомендации «Кистозный фиброз (муковисцидоз)» – Текст: электронный / А.А. Баранов, Л.С. Намазова-Баранова, С.И. Куцев, [и др.] // Рубрикатор клинических рекомендаций – URL: [https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/372\\_2](https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/372_2). – Дата публикации: 03.09.2021.
18. Клинические рекомендации по диагностике и лечению фенилкетонурии и нарушений обмена тетрагидробиоптерина –Текст: электронный / Е.Г. Бакулина, А.А. Баранов, Т.Э. Боровик, [и др.] // Рубрикатор клинических рекомендаций – URL: [https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/482\\_1](https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/482_1). – Дата публикации: 17.12.2020.
19. Колбин, А.С. Муковисцидоз как социально-экономическая проблема / А.С. Колбин, Ю.М. Гомон, О.И. Карпов, [и др.] // Качественная клиническая практика. — 2020. — №5. — С. 38—49.

20. Кусова, З.А. Результаты массового скрининга новорожденных на муковисцидоз в Москве / З.А. Кусова, Н.В. Петрова, Т.А. Васильева, [и др.] // Вопросы современной педиатрии. – 2010. – Т.9, №6. – С. 26–30.
21. Новиков, П.В. Неонатальный скрининг наследственных болезней обмена веществ и его перспективы в Российской Федерации / П.В. Новиков // Справочник заведующего КДЛ. – 2014. – № 2. – С. 24-36.
22. Новиков, П. В. Первые итоги расширенного неонатального скрининга на наследственные болезни обмена веществ в Российской Федерации / П.В. Новиков, А.А. Ходунова // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2012. – Т.57, №5. – С. 5–12.
23. Новиков, П.В. Массовый скрининг новорожденных на наследственные болезни в России: первые итоги расширенного скрининга // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2013. – Т.58, №5. – С. 98–99.
24. Павлов, А.Е. Перспективы применения метода секвенирования следующего поколения (NGS) в клинической практике скрининга новорожденных / А.Е. Павлов, А.М. Смирнов, М.А. Зайцева // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2013. – Т.58, № 2. – С. 37–40.
25. Приказ Минздравсоцразвития РФ от 22 марта 2006 г. N 185 О массовом обследовании новорожденных детей на наследственные заболевания»: Министерство здравоохранения Российской Федерации: Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения – Текст: электронный // Техэксперт. Консорциум Кодекс – URL: <https://docs.cntd.ru/document/901974446>. (дата обращения: 23.07.2023).
26. Приказ Министерства Здравоохранения РФ от 13 июля 2022 г. N 274 н «Об утверждении порядка оказания медицинской помощи пациентам с врожденными и (или) наследственными заболеваниями»: Министерство здравоохранения Российской Федерации: Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения. – Текст: электронный // Техэксперт. Консорциум Кодекс – URL: <https://docs.cntd.ru/document/350761158> (дата обращения: 23.07.2023)

27. Регистр больных муковисцидозом в Российской Федерации (2018 год) / под ред. Е. Л. Амелиной, Н. Ю. Каширской, Е. И. Кондратьевой [и др.]. – Москва : Медпрактика–М, 2020. – 68 с.
28. Современные медико-социальные проблемы неонатологии / А.А. Баранов, Г.В. Яцык — М.: ПедиатрЪ, 2015. – 350 с.
29. Тебиева, И.С. Опыт мировой и отечественной практики неонатального скрининга на наследственные заболевания / И.С. Тебиева, Ф.К. Лагкуева, М.Ф. Логачев, [и др.] // Педиатрия. – 2012. –Т.91, №1. – С. 128–132.
30. Хромов-Борисов, Н.Н. Биостатистические программы свободного доступа. / Н.Н. Хромов-Борисов // Травматология и ортопедия России. – 2015. – Т.21, № 4 – С.154–159.
31. Хромов-Борисов, Н.Н. Гармонизация статистических доказательств и предсказаний в биомедицине. / Н.Н. Хромов-Борисов // Сборник докладов I Открытого российского статистического конгресса. Российская ассоциация статистиков; Федеральная служба государственной статистики РФ; Новосибирский государственный университет экономики и управления "НИНХ". – 2016. – С. 39–53.
32. “9th European Conference on Rare Diseases & Orphan Products (ECRD Vienna 2018). – Vienna, Austria. – 2018”. // Orphanet journal of rare diseases. – 2018. – Vol.13. – P.15.
33. Afzal, R.M. The impact of consanguinity on the frequency of inborn errors of metabolism / R.M. Afzal, A.M. Lund, F. Skovby // Danish medical journal. – 2018. – Vol.65(10). – P. 6–10.
34. Almannai, M. Newborn screening: a review of history, recent advancements, and future perspectives in the era of next generation sequencing / M. Almannai, R. Marom, V.R. Sutton // Curr Opin Pediatr. – 2016. – Vol.28(6). – P.694–699.
35. Andermann, A. Revisiting Wilson and Jungner in the genomic age: a review of screening criteria over the past 40 years / A. Andermann, I. Blancquaert, S. Beauchamp, V. Dery // WHO bulletin. – 2008. – Vol.86. – P.317–319.

36. Angelis, A. Socio-economic burden of rare diseases: A systematic review of cost of illness evidence / A. Angelis, D. Tordrup, P. Kanavos // *Health Policy*. – 2015. – Vol.119. – P.964–979.
37. Ashino, J. Molecular characterization of galactosemia (Type 1) mutations in Japanese / J. Ashino, Y. Okano, I. Suyama, [et al.] // *Hum Mutat*. – 1995. – Vol.6. – P.36–43.
38. Baird, P.A. Genetic disorders in children and young adults: a population study / P.A. Baird, T.W. Anderson, H.B. Newcombe, R.B. Lowry // *Am. J. Hum. Genet*. – 1988. – Vol.42(5). – P.677–93.
39. Bell, S.C. New pharmacological approaches for cystic fibrosis: promises, progress, pitfalls / S.C. Bell, K. De Boeck, M.D. Amaral // *Pharmacol Ther*. – 2015. – Vol.145. – P.19–34.
40. Benjamin, E.J. Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report From the American Heart Association / E.J. Benjamin, S.S. Virani, C.W. Callaway, [et al.] // *Circulation*. – 2018. – Vol.137(12). – P.67–492.
41. Berg, J.S. Newborn Sequencing in Genomic Medicine and Public Health / J.S. Berg, P.B. Agrawal, D.B. Bailey, [et al.] // *Pediatrics*. – 2017. – Vol.139(2). – P.1–13.
42. Berry, G.T. Disorders of galactose metabolism / G.T. Berry, J.H. Walter J.M Saudubray, G. van den Berghe, J.H. Walter // *Inborn metabolic diseases: diagnosis and treatment*. Springer, Heidelberg. – 2012. – Vol.7. – P.143–149.
43. Berry, S.A. Newborn screening / S.A. Berry // *Clin Perinatol*. – 2015. – Vol.42(2). – P.441–453.
44. Bhattacharjee, A. Development of DNA confirmatory and high-risk diagnostic testing for newborns using targeted next-generation DNA sequencing / A. Bhattacharjee, T. Sokolsky, S.K. Wyman, [et al.] // *Genet Med*. – 2015. – Vol.17(5). – P.337–347.
45. Biesecker, L.G. Diagnostic clinical genome and exome sequencing / L.G. Biesecker, R.C. Green // *N Engl J Med*. – 2014. – Vol.370(25). – P.2418–2425.

46. Bobadilla, J.L. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations—correlation with incidence data and application to screening / J.L. Bobadilla, M.Jr. Macek, J.P. Fine, P.M. Farrell // *Hum Mutat.* – 2002. – Vol.19(6). – P.575–606.
47. Boemer, F. A next-generation newborn screening pilot study: NGS on dried blood spots detects causal mutations in patients with inherited metabolic diseases / F. Boemer, C. Fasquelle, S. d'Otreppe, [et al.] – Text : electronic // *Sci Rep.* – 2017. – Vol.7(1). – 17641 – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29247206> / (date of access: 21.07.2023).
48. Bosch, A.M. Classical galactosaemia revisited / A.M. Bosch // *J Inherit Metab Dis.* – 2006. – Vol.29. – P.516–525. –
49. Boucher, R.C. Evidence for airway surface dehydration as the initiating event in CF airway disease / R.C. Boucher // *J Intern Med.* – 2007. – Vol.261(1). – P.5–16.
50. Campeau, P.M. A 25-year longitudinal analysis of treatment efficacy in inborn errors of metabolism / P.M. Campeau, C.R. Scriver, J.J. Mitchell // *Mol Genet Metab.* – 2008. – Vol.95. – P.11–16.
51. Chaudry, G. Abdominal manifestations of cystic fibrosis in children / G. Chaudry, O.M. Navarro, D.S. Levine, K. Oudjhane // *Pediatr Radiol.* – 2006. – Vol.36(3). – P.233–240.
52. Chmiel, J.F. Antibiotic and anti-inflammatory therapies for cystic fibrosis / J.F. Chmiel, M.W. Konstan, J.S. Elborn – Text : electronic // *Cold Spring Harb Perspect Med.* – 2013. – Vol.3(10). – a009779 – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3784810> (date of access: 29.09.2022).
53. Christianson, A. March of Dimes Global Report on Birth Defects: The hidden toll of dying and disabled children / A. Christianson, C.P. Howson, B. Modell // *March of Dimes Birth Defects Foundation.* – 2005. – P.14–19.
54. 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(2). – P.199–215.

55. Coelho, A.I. Arginine functionally improves clinically relevant human galactose-1-phosphate uridylyltransferase (GALT) variants expressed in a prokaryotic model / A.I. Coelho, M. Trabuco, M. Silva, [et al.] // *J Inherit Metab Dis Rep.* – 2015. – Vol.23. – P.1–6.
56. Coelho, A.I. Sweet and sour: an update on classic galactosemia / A.I. Coelho, M.E. Rubio-Gozalbo, J.B. Vicente, I. Rivera // *J Inherit Metab Dis.* – 2017. – Vol.40(3). – P.325–342.
57. Collins, F.S. A new initiative on precision medicine / F.S. Collins, H. Varmus // *N Engl J Med.* – 2015. – Vol.372(9). – P.793–795.
58. Colquhoun, D. An investigation of the false discovery rate and the misinterpretation of p-values v/ D. Colquhoun. – Text : electronic // *Royal Society Open Science.* – 2014. – Vol.1(3). – URL: <http://doi.org/10.1098/rsos.140216>. (date of access: 09.05.2022).
59. Coss, K.P. Classical Galactosaemia in Ireland: incidence, complications and outcomes of treatment / K.P. Coss, P.P. Doran, C. Owoeye, [et al.] // *J Inherit Metab Dis.* – 2013. – Vol.36. – P.21–27.
60. Crossley, J.R. Dried-blood spot screening for cystic fibrosis in the newborn / J.R. Crossley, R.B. Elliott, P.A. Smith // *Lancet.* – 1979. – Vol.1. – P.472–474.
61. Crossley, J. R. Neonatal screening for cystic fibrosis, using immunoreactive trypsin assay in dried blood spots / J.R. Crossley, P.A. Smith, B.W. Edgar, P.D. Gluckman, R.B. Elliott // *Clinica Chimica Acta.* – 1981. – Vol.113(2). – P.111–121.
62. Cuthbert, C. Diagnosis of inherited disorders of galactose metabolism / C. Cuthbert, H. Klapper, L. Elsas // *Curr Protoc Hum Genet.* – 2008. – Ch.17. – Unit 17.15.
63. Danecka, M.K. Mapping the functional landscape of frequent phenylalanine hydroxylase (PAH) genotypes promotes personalized medicine in phenylketonuria / M.K. Danecka, M. Woidy, J. Zschocke, , [et al.] // *J Med Genet.* – 2015. – Vol.52(3). – P.175–185.



64. Davis, P.B. Cystic fibrosis since 1938 / P.B. Davis. // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2006. – Vol.173(5). – P.475–482.
65. Deodato, F. Inborn errors of metabolism: An update on epidemiology and on neonatal-onset hyperammonemia / F. Deodato, S. Boenzi, C. Rizzo, [et al.] // *Acta Paediatr Suppl.* – 2004. – Vol.93). – P.18–21.
66. Dechecchi, M.C. Molecular basis of cystic fibrosis: from bench to bedside / M.C. Dechecchi, A. Tamanini, G. Cabrini // *Ann Transl Med.* – 2018. – Vol.6(17). – P.334.
67. Denning, G.M. Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in chloride secretory epithelia / G.M. Denning, L.S. Ostedgaard, S.H. Cheng, [et al.] // *J Clin Invest.* – 1992. – Vol.89(1). – P.339–349.
68. Dhondt, J.L. The wonderful history of neonatal screening / J.L. Dhondt, J.P. Farriaux // *Ann Biol Clin.* – 2000. – Vol.(3). – P.267–276.
69. Driscoll, C.J. Newborn screening systems: the complete perspective / C.J. Driscoll, B. McPherson. // San Diego: Plural Publishing Inc., – 2010. – P.229.
70. Elborn, J.S. Cystic fibrosis / J.S. Elborn // *Lancet.* – 2016. – Vol.388. – P.2519-2531.
71. El-Hattab, A.W. Inborn Errors of Metabolism / A.W. El-Hattab // *Clin Perinatol.* – 2015. – Vol.42(2). – P.413–439.
72. Elsas, L.J. The molecular biology of galactosemia / L.J. Elsas, K. Lai. // *Genet Med.* – 1998 – Vol.1(1). – P.40–48.
73. Erez, A. Metabolic dysregulation in monogenic disorders and cancer - finding method in madness / A. Erez, R. DeBerardinis // *J Nat Rev Cancer.* – 2015. – Vol.7(15). – P.440–448.
74. Farrell, P.M. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report / P.M. Farrell, B.J. Rosenstein, T.B. White, [et al.] // *J Pediatr.* – 2008. – Vol.153(2). – P.4–14
75. Ferreira, C.R. Inborn errors of metabolism / C.R. Ferreira, C.D.M. van Karnebeek // *Handb Clin Neurol.* – 2019. – Vol.162. – P.449–481.

76. Ferreira, C.R. A proposed nosology of inborn errors of metabolism / C.R. Ferreira, C.D.M. van Karnebeek, J. Vockley, N. Blau // *Genet Med.* – 2019. – Vol.21(1). – P.102–106.
77. Ficicioglu, C. Duarte (DG) galactosemia: a pilot study of biochemical and neurodevelopmental assessment in children detected by newborn screening / C. Ficicioglu, N. Thomas, [et al.] // *Mol Genet Metab.* – 2008. – Vol.95(4). – P.206–212.
78. Ficicioglu, C. New tools and approaches to newborn screening: ready to open Pandora's box? / C. Ficicioglu – Text : electronic // *Cold Spring Harb Mol Case Stud.* – 2017. – Vol.3(3). – a001842 . – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28487886> (date of access: 01.02.2022).
79. Folling. A. The excretion of phenylpyruvic acid in the urine, an anomaly of metabolism in connection with imbecility/ A. Folling // *Zeitschrift fur Physiologische Chemie.* – 1934. – Vol.227. – P.169–176.
80. Friedman, J.M. Genomic newborn screening: public health policy considerations and recommendations / J.M. Friedman, M. Cornel, A. Goldenberg, [et al.] // *BMC Med Genomics.* – 2017. – Vol.9(10). – P.9.
81. Gahl, W.A. The National Institutes of Health Undiagnosed Diseases Program: insights into rare diseases / W.A. Gahl, T.C. Markello, C. Toro, [et al.] // *Genet. Med.* – 2012. – Vol.14. – P.51–59.
82. Green, M.N. Studies in cystic fibrosis of the pancreas; protein pattern in meconium ileus / M.N. Green, J.T. Clarke, H. Shwachman // *Pediatrics.* – 1958. – Vol.21(4). – P.635–641.
83. Gropman, A.L. Patterns of brain injury in inborn errors of metabolism / A.L. Gropman // *Semin Pediatr Neurol.* – 2012. – Vol.19(4). – P.203–210.
84. Gurian, E.A. Expanded newborn screening for biochemical disorders: the effect of a false-positive result / E.A. Gurian, D.D. Kinnamon, J.J. Henry, S.E. Waisbren // *Pediatrics.* – 2006. – Vol.117(6). – P.1915–1921.
85. Guthrie, R. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants / R. Guthrie, A. Susi // *Pediatrics.* – 1963. – Vol.32. – P.318–343.

86. Guthrie, R. Phenylketonuria screening programs / R. Guthrie // *J Engl Med.* – 1963. – Vol.269. – P.52–53.
87. Guy, O. Two human trypsinogens. Purification, molecular properties, and N-terminal sequences / O. Guy, D. Lombardo, D.C. Bartelt, [et al.] // *Biochemistry.* – 1978. – Vol.17(9). – P.1669–1675.
88. Hamburg, M.A. The path to personalized medicine / M.A. Hamburg, F.S. Collins // *N Engl J Med.* – 2010. – Vol.363(4). – P.301–304.
89. Hammer, Ø. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis / Ø. Hammer, D. Harper., P.D. Ryan. // *Palaeontologia Electronica.* – 2001. – Vol. 4(1). – P.9.
90. Harms, E. Neonatal screening for metabolic and endocrine disorders / E. Harms, B. Olgemöller // *Dtsch Arztebl Int.* – 2011. – Vol.108(1-2). – P.11-21.
91. Higgins, C.F. ABC transporters: from microorganisms to man / C.F. Higgins // *Annu Rev Cell Biol.* – 1992. – Vol.8. – P.67–113.
92. Janeckova, H. Targeted metabolomic analysis of plasma samples for the diagnosis of inherited metabolic disorders / H. Janeckova, K.Hron, P. Wojtowicz, [et al.] // *J Chromatogr A.* – 2012. – Vol.1226. – P.11–17.
93. Johnson, V.E. Revised standards for statistical evidence / V.E. Johnson // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2013. – Vol.110(48). – P.19313–19317.
94. Karaceper, M.D. The health system impact of false positive newborn screening results for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: a cohort study / M.D. Karaceper, P. Chakraborty, D. Coyle., [et al.] // *Orphanet Journal of Rare Diseases.* – 2016. – Vol.3. – P.11–12.
95. Kaye, C.I. Introduction to the newborn screening fact sheets / C.I. Kaye, F. Accurso, S. La Franchi, [et al.] // *Pediatrics.* – 2006. – Vol.118(3). – P.1304–1312.
96. Kelly, T. Gastrointestinal Manifestations of Cystic Fibrosis / T. Kelly, J. Buxbaum // *Dig Dis Sci.* – 2015. – Vol.60(7). – P.1903–1913.
97. Koch, R. Hospital screening programs aid identification of PKU / R. Koch, J.C. Dobson // *Hosp Top.* – 1968. – Vol.46. – P.111–113.

98. Kronn, D. Navigating Newborn Screening in the NICU: A User's Guide / D. Kronn // *Neoreviews*. – 2019. – Vol.20. – P.280–291.
99. Larsson, A. Newborn screening: the role of the obstetrician / A. Larsson, B.L. Therrell // *Clin Obstet Gynecol*. – 2002. – Vol.45. – P.697– 710.
100. Leonard, J.V. Diagnosis and early management of inborn errors of metabolism presenting around the time of birth / J.V. Leonard, A.A. Morris // *Acta Paediatr*. – 2006. – Vol.95(1). – P.6–14.
101. Levy, P.A. Inborn Errors of Metabolism: Part 1: Overview / P.A. Levy // *Pediatr Rev*. – 2009. – Vol.30. – P.131–137.
102. Lim, M.T. Diagnosis of cystic fibrosis in London and South East England before and after the introduction of newborn screening / M.T. Lim, C. Wallis, J.F. Price, [et al.] // *Arch Dis Child*. – 2014. – Vol.99(3). – P.197–202.
103. Liu, L. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000-15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals / L. Liu, S. Oza, D. Hogan, [et al.] // *Lancet*. – 2016. – Vol.388. – P.3027–3035.
104. Mak, C.M. Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: review and update / C.M. Mak, H.C. Lee, A.Y. Chan, C.W. Lam // *Crit.Rev.Clin.Lab.Sci*. – 2013. – Vol.50(6). – P.142–162.
105. Mandal, R. The role of the Human Metabolome Database in inborn errors of metabolism / R. Mandal, D. Chamot, D.S. Wishart // *J Inherit Metab Dis*. – 2018. – Vol.41(3) – P.329–336.
106. Mariska, M.G. Variation of a test's sensitivity and specificity with disease prevalence / M.G. Mariska, A. W.S. Rutjes, J. B. Reitsma, [et al.] // *Bossuyt CMAJ*. – 2013. – Vol.185(11). – P.537–544.
- 107.
108. Maxim, L.D. Screening tests: a review with examples / L.D. Maxim, R. Niebo, M.J. Utell // *Inhal Toxicol*. – 2014. – Vol.26(13). – P.811–828.
109. Menkes, J.H. A sex-linked recessive disorder with retardation of growth, peculiar hair and focal cerebral and cerebellar degeneration inherited metabolic diseases

of the nervous system / J.H. Menkes, M. Alter, G.K. Steigleder, [et al.] // *Pediatrics*. – 1962. – Vol.29. – P.764–779

110. Miller, D.T. ACMG Secondary Findings Working Group. ACMG SF v3.0 list for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing: a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) / D.T. Miller, K. Lee, W.K. Chung., [et al.] // *Genet Med*. – 2021. – Vol.23(8). – P.1381– 1390.

111. Mussap, M. Metabolomics: a challenge for detecting and monitoring inborn errors of metabolism / M. Mussap, M. Zaffanello, V. Fanos // *Ann Transl Med*. – 2018. – Vol.6(17). – P.338.

112. Newcombe, P. J. A Comparison of Bayesian and Frequentist Approaches to Incorporating External Information for the Prediction of Prostate Cancer Risk / P. J. Newcombe, B.H. Reck, J. Sun, [et al.] // *Genetic Epidemiology*. – 2012. – Vol.36. – P. 71–83.

113. Ooi, C.Y. Cystic fibrosis from the gastroenterologist's perspective / C.Y. Ooi, P.R. Durie // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. – 2016. – Vol.13(3). – P.175–185

114. Pederzini, F. Development of a screening system for cystic fibrosis: meconium or blood spot trypsin assay or both? / F. Pederzini, D. Faraguna, L. Giglio, [et al.] // *Acta Paediatr Scand*. – 1990. – Vol.79(10).– P.935–942.

115. PHG Foundation. Next steps in the sequence: The implications of whole genome sequencing for health in the UK – Text : electronic // Cambridge: PHG Foundation. – 2011. – URL: <https://www.phgfoundation.org/report/next-steps-in-the-sequence>. (date of access: 01.05.2021).

116. Pourfarzam, M. Newborn Screening for inherited metabolic disorders; news and views / M. Pourfarzam, F. Zadhoush // *J Res.Med.Sci*. – 2013. – Vol.18(9). – P.801–808.

117. Prosser, R. Screening for cystic fibrosis by examination of meconium / R. Prosser, H. Owen, F. Bull, [et al.] // *Arch Dis Child*. – 1974. – Vol.49(8). – P.597–601.

118. Rommens, J.M. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping / J.M. Rommens, M.C. Iannuzzi, B. Kerem, [et al.] // *Science*. – 1989. – Vol.245. – P.1059–1065.
119. Sanderson, S. The incidence of inherited metabolic disorders in the west Midlands / S.Sanderson, A. Green, M.A. Preece, H. Burton // *Arch Dis Child*. – 2006. – Vol.91. – P. 896–899.
120. Sathe, M. Meconium ileus in Cystic Fibrosis / M. Sathe, R. Houwen // *J Cyst Fibros*. – 2017 – Vol.16. – Suppl.2: S32-S39.
121. Sayson, B. Retrospective analysis supports algorithm as efficient diagnostic approach to treatable intellectual developmental disabilities / B. Sayson, M.A. Popurs, M. Lafek, [et al.] // *Mol Genet Metab*. – 2015. – Vol.115(1). – P.1–9.
122. Saudubray, J.M. Inborn Errors of Metabolism Overview: Pathophysiology, Manifestations, Evaluation, and Management / J.M. Saudubray, À. Garcia-Cazorla // *Pediatr Clin North Am*. – 2018. – Vol.65(2) – P.179–208.
123. Saudubray, J.M. Clinical approach to treatable inborn metabolic diseases: an introduction / J.M. Saudubray, F. Sedel, J.H. Walter // *J Inherit Metab Dis*. – 2006. – Vol.29(2-3). – P.261–274.
124. Scaturro, G. Newborn screening of inherited metabolic disorders by tandem mass spectrometry: past, present and future / G. Scaturro, C. Sanfilippo, M. Piccione, [et al.] // *Pediatr Med Chir*. – 2013. – Vol.35(3). – P.105–109.
125. Scriver, C.R. Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency / C.R. Scriver, A.L. Beaudet, S.W. Sly, D. Valle, [et al.] // *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. – 8 ed. New York, NY. –McGraw-Hill. – 2001. – P.1667–1724.
126. Seymour, C.A. Newborn screening for inborn errors of metabolism: a systematic review / C.A. Seymour, M.J. Thomason, R.A. Chalmers, [et al.] // *Health Technol Assess*. – 1997. – Vol.1. – P.95.
127. Shanmuganathan, M. New Advances for Newborn Screening of Inborn Errors of Metabolism by Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry (CE-MS) / M.

Shanmuganathan, P. Britz-McKibbin // *Methods Mol Biol.* – 2019. – Vol.1972. – P.139–163.

128. Sharma, S. Inborn Errors of Metabolism and Epilepsy: Current Understanding, Diagnosis, and Treatment Approaches / S. Sharma, A.N. Prasad // *Int J Mol Sci.* – 2017. – Vol.18(7). – P.1384.

129. Shashi, V. The utility of the traditional medical genetics diagnostic evaluation in the context of next-generation sequencing for undiagnosed genetic disorders / V. Shashi, A. McConkie-Rosell, B. Rosell, [et al.] // *Genet Med.* – 2014. – Vol.16. – P.176–182.

130. Solomon, B.D. Applying Genomic Analysis to Newborn Screening. NISC Comparative Sequencing Program / B.D. Solomon, D.E. Pineda-Alvarez, K.A. Bear, [et al.] // *Mol Syndromol.* – 2012. – Vol.3(2). – P.59–67.

131. Sterne, J.A. Sifting the evidence-what's wrong with significance tests? / J.A. Sterne, D.G. Smith // *BMJ.* – 2001. – Vol.322. – P.226–231.

132. Stoltz, D.A. Origins of cystic fibrosis lung disease / D.A. Stoltz, D.K. Meyerholz, M.J. Welsh // *N Engl J Med.* – 2015. – Vol.372(4). – P.351–362.

133. Sumaily, K.M. Phenylketonuria: A new look at an old topic, advances in laboratory diagnosis, and therapeutic strategies / K.M. Sumaily, A.H. Mujamammi // *Int J Health Sci.* – 2017. – Vol.11(5). – P.63–70.

134. Szabo, E. Diagnostics of inborn errors of metabolism: laboratory approaches / E. Szabo, L. Balogh, A. Szabo, I. Szatmari // *Orv Hetil.* – 2017. – Vol.158(48). – P.1903–1907.

135. Tiwari, S. Communication Impairments in Children with Inborn Errors of Metabolism: A Preliminary Study / S. Tiwari, D. Kallianpur, K.A. DeSilva // *Indian J Psychol Med.* – 2017. – Vol.39. – P.146–151

136. Tsui, L.C. The cystic fibrosis gene: a molecular genetic perspective / L.C. Tsui, R. Dorfman // *Cold Spring Harb Perspect Med.* – 2013. – Vol.3(2).

137. Tluczek, A. Newborn Screening: An Appeal for Improved Parent Education / A. Tluczek, K.M. Orland, S.W.Nick, R.L. Brown // *J Perinat Neonatal Nurs.* – 2009. – Vol.23(4). – P.326–334.

138. Vernon, H.J. Inborn Errors of Metabolism: Advances in Diagnosis and Therapy / H.J. Vernon // *JAMA Pediatr.* – 2015. – Vol.169(8). – P.778–782.
139. Waisbren, S.E. Newborn screening compared to clinical identification of biochemical genetic disorders / S.E. Waisbren, C.Y. Read, M. Ampola, [et al.] // *J Inherit Metab Dis.* – 2002. – Vol.25. – P.599–600.
140. Waisbren, S.E. Psychosocial Factors Influencing Parental Interest in Genomic Sequencing of Newborns / S.E. Waisbren, C.M. Weipert, R.C. Walsh, [et al.] // *Pediatrics.* – 2016. – Vol.137(1). – P.30–35.
141. Wang, X. Combined genetic screening and traditional biochemical screening to optimize newborn screening systems / X. Wang, Y.Y. Wang, D.Y. Hong, [et al.] // *Clin Chim Acta.* – 2022. – Vol.1(528). – P.44–51.
142. Waters, D. Global birth prevalence and mortality from inborn errors of metabolism: a systematic analysis of the evidence / D. Waters, D. Adeloye, D. Woolham, [et al.] // *Journal of global health.* – 2018. – Vol.8(2). – P.1–12.
143. Wertheim-Tysarowska, K. Genetic analysis in inherited metabolic disorders--from diagnosis to treatment. Own experience, current state of knowledge and perspectives / K. Wertheim-Tysarowska, M. Gos, J. Sykut-Cegielska, J. Bal // *Dev Period Med.* – 2015. – Vol.19(4). – P.413–431.
144. Wilcken, B. Medicine. Newborn screening: gaps in the evidence / B. Wilcken // *Science.* – 2013. – Vol.342. – P.197–198.
145. Wilcken, B. Newborn screening / B. Wilcken, V. Wiley // *Pathology.* – 2008. – Vol.40(2). – P.104–115.
146. Wilcken, B. Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry / B. Wilcken, V. Wiley, J. Hammond, K. Carpenter // *N Engl J Med.* – 2003. – Vol.348(23). – P.2304–2312.
147. 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(5). – P.377–387.



148. Wilson, JM.G. The principles and practice of screening for disease / JM.G. Wilson, G. Jungner – Text : electronic // World Health Organization. – 1968. – URL: <https://www.who.int/bulletin/volumes/86/4/07-050112/en>. (date of access: 01.05.2020).
149. Wong, L.J. Galactose-1-phosphate uridylyltransferase. Rate studies confirming a uridylyl-enzyme intermediate on the catalytic pathway / L.J. Wong, P.A. Frey // Biochemistry. – 1974. – Vol.13. – P.3889–3894.
150. Woolf, L.I. Treatment of phenylketonuria with a diet low in phenylalanine / L.I. Woolf, R. Griffiths, A. Moncrieff // J Br Med. – 1955. – Vol.1(4905). – P.57–64.
151. Yang, N. Inborn errors of metabolism detectable by tandem mass spectrometry in Beijing / N. Yang, L.F. Gong, J.Q. Zhao, [et al.] // J Pediatr Endocrinol Metab. – 2020. – Vol.33(5). – P.639–645.