

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2024.09.18-31>

Клинико-генетическая характеристика пациентов с глутаровой ацидурией типа 2, выявленных по программе расширенного неонатального скрининга в Российской Федерации

Баранова П.В.¹, Байдакова Г.В.¹, Лендоева Д.В.¹, Андреева Л.П.², Гамзатова А.И.³, Колбасин Л.Н.⁴, Нургалиева Л.Р.⁵, Сикора Н.В.⁶, Федотова Т.В.⁷, Цыганкова П.Г.¹, Иванова О.Н.¹, Назаренко Я.Д.¹, Пчелина С.Н.^{1,8,9}, Захарова Е.Ю.¹

- 1 – ФГБНУ Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова
115522, г. Москва, ул. Москворечье, д. 1
- 2 – ГУЗ Саратовская областная детская клиническая больница
410028, г. Саратов, ул. Вольская, д. 6
- 3 – ГБУ РД Республики Дагестан Республиканский перинатальный центр им. Омарова С.-М.А.
367027, г. Махачкала, ул. Магомедова, д. 2
- 4 – БУ Сургутский окружной клинический центр охраны материнства и детства
628405 Сургут, Пролетарский проспект, д. 15
- 5 – ГБУЗ Республиканский медико-генетический центр
450076, г. Уфа, ул. Мажита Гафури, д. 74
- 6 – КГБУЗ Перинатальный центр имени профессора Г.С. Постола Министерства здравоохранения Хабаровского края
680028, г. Хабаровск, ул. Истомина, д. 85
- 7 – БУЗ ВО Воронежская областная клиническая больница №1
394066, г. Воронеж, Московский проспект, д. 151
- 8 – ФГБУ Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»
188300, Ленинградская область, г. Гатчина, мкр. Орлова роща, д. 1
- 9 – ФГБОУ Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова
Министерства здравоохранения России
197022, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8

Глутаровая ацидурия 2 типа (ГА2) или множественная недостаточность ацил-КоА-дегидрогеназ (MADD, OMIM 231680) – редкое жизнеугрожающее аутосомное-рецессивное заболевание, связанное с нарушением метаболизма жирных кислот и аминокислот. Данное заболевание включено в перечень заболеваний для расширенного неонатального скрининга в Российской Федерации (РФ) с января 2023 года. В результате первичного скрининга в региональных центрах была сформирована группа новорожденных для этапа подтверждающей диагностики в ФГБНУ Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова (ФГБНУ МГНЦ) (N=27). При подтверждающей диагностике проводилось повторное определение концентрации аминокислот и ацилкарнитинов крови методом тандемной масс-спектрометрии (ТМС) (ретест), а также определение концентрации органических кислот мочи методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии (ГХ-МС) и молекулярно-генетическое исследование кодирующей области генов *ETFA*, *ETFB*, *ETFDH*. Диагноз ГА2 был подтвержден у 6 пациентов. Частота ГА2 в РФ составила 1:205233 живых новорожденных, что сопоставимо с данными по Европе и США. При подтверждающей биохимической диагностике выявлено, что наиболее информативным биомаркером для постановки диагноза является повышение концентрации среднепочечных ацилкарнитинов (C8-C12) и определение ранее неиспользованного в алгоритме скрининга ГА2-индекса (соотношение $[C4 \times C5 \times C8 \times C14] / [C0 \times C3]$), повышение которого было выявлено у 5 из 6 пациентов. Молекулярные причины развития ГА2 выявлены у всех 6 пациентов. У пяти новорожденных обнаружены биаллельные мутации в гене *ETFDH* (четыре в FAD-связывающем домене), у одного новорожденного выявлены ранее не описанные нуклеотидные варианты в гене *ETFA*. На момент обследования симптомы присутствовали у трех новорожденных (все носители мутаций в гене *ETFDH*). У двух пациентов с тяжелой формой ГА2 (один с летальным исходом) был выявлен вариант с.652G>A (p.Asp218Asn) в гомозиготном состоянии, что позволяет предположить его ассоциацию с тяжелым неонатальным фенотипом ГА2. По результатам скрининга можно сделать вывод о том, что мутации в гене *ETFDH* могут быть ассоциированы с более тяжелым фенотипом ГА2, чем предполагалось ранее, а также рекомендовать расчет ГА2-индекса $[C4 \times C5 \times C8 \times C14] / [C0 \times C3]$ для повышения эффективности биохимического скрининга на ГА2.

Ключевые слова: расширенный неонатальный скрининг, глутаровая ацидурия 2 типа, множественный дефицит ацил-КоА-дегидрогеназы (MADD).

Для цитирования: Баранова П.В., Байдакова Г.В., Лендоева Д.В., Андреева Л.П., Гамзатова А.И., Колбасин Л.Н., Нургалиева Л.Р., Сикора Н.В., Федотова Т.В., Цыганкова П.Г., Иванова О.Н., Назаренко Я.Д., Пчелина С.Н., Захарова Е.Ю. Клинико-генетическая характеристика пациентов с глутаровой ацидурией типа 2, выявленных по программе расширенного неонатального скрининга в Российской Федерации. *Медицинская генетика* 2024; 23(9): 18-31.

Автор для корреспонденции: Захарова Екатерина Юрьевна; e-mail: doctor.zakharova@gmail.com

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ МГНЦ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 12.08.2024

Clinical and genetic characteristics of glutaric aciduria type 2 patients identified during the expanded neonatal screening program in the Russian Federation

Baranova P.V.¹, Baydakova G.V.¹, Lendoeva D.V.¹, Andreeva L.P.², Gamzatova A.I.³, Kolbasin L.N.⁴, Nurgalieva L.R.⁵, Sikora N.V.⁶, Fedotova T.V.⁷, Tsygankova P.G.¹, Ivanova O.N.¹, Nazarenko Y.D.¹, Pchelina S.N.^{1,8,9}, Zakharova E.Y.¹

- 1 – Research Centre for Medical Genetics
1, Moskvorechye st., Moscow, 115522, Russian Federation
- 2 – Saratov Regional Children's Clinical Hospital
6, Volskaya st., Saratov, 410028, Russian Federation
- 3 – Republican Perinatal Center named after Omarov S.-M.A.
2, Magomedov st., Makhachkala, 367027, Russian Federation
- 4 – Surgut District Clinical Center for Maternal and Child Health
15, Proletarsky av., Surgut, 628405, Russian Federation
- 5 – Republican Medical Genetics Center
74, Mazhit Gafuri st., Ufa, 450076, Russian Federation
- 6 – Perinatal Center named after Professor G.S. Postol of the Ministry of Health of the Khabarovsk region
85, Istomin st., Khabarovsk, 680028, Russian Federation
- 7 – Voronezh Regional Clinical Hospital No. 1
151, Moskovsky av., Voronezh, 394066, Russian Federation
- 8 – Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute»
1, Orlova roshcha, Gatchina, Leningradskaya oblast, 188300, Russian Federation
- 9 – Pavlov First Saint Petersburg State Medical University
6-8, Lev Tolstoy st., Saint Petersburg, 197022, Russian Federation

Glutaric aciduria type 2 (GA2), or multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MADD, OMIM 231680), is a rare life-threatening disorder associated with impaired metabolism of fatty acids and amino acids. GA2 has been included in the expanded neonatal screening program in the Russian Federation since January, 2023. Following the primary screening in the regional centers, a group of newborns underwent the second stage of confirmatory diagnostics at the Research Center for Medical Genetics (N = 27). Concentrations of amino acids and acylcarnitines in the blood were remeasured using MS/MS, organic acids in the urine were analyzed using GC-MS, and a molecular genetic study of the coding regions of the *ETFA*, *ETFB*, and *ETFDH* genes was conducted. GA2 was confirmed in 6 patients. The frequency of GA2 was 1 in 205,233 live births, which was comparable to the data from Europe and the USA. An increase in the concentration of medium-chain acylcarnitines (C8–C12) and determination of «GA2 index» ($[C4 \times C5 \times C8 \times C14] / [C0 \times C3]$, which has not been previously used in the screening algorithm) were found to be informative biomarkers for GA2. The «GA2 index» was increased in 5 out of the 6 patients. Five newborns had biallelic mutations in the *ETFDH* gene (four in the FAD-binding domain), and one newborn had previously undescribed variants in the *ETFA* gene. At the time of examination, symptoms were present in three newborns (all carriers of the *ETFDH* mutations). Two patients with a severe form of GA2 (one with a lethal outcome) were homozygous carriers of the c.652G>A (p.Asp218Asn) variant, suggesting an association between this variant and a severe neonatal GA2 phenotype. Thus, mutations in the *ETFDH* gene may be associated with a more severe phenotype of GA2 than previously estimated. Determination of the «GA2 index» ($[C4 \times C5 \times C8 \times C14] / [C0 \times C3]$) may increase the effectiveness of biochemical screening for GA2.

Keywords: expanded newborn screening, glutaric aciduria type 2, multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MADD), Russian Federation.

For citation: Baranova P.V., Baydakova G.V., Lendoeva D.V., Andreeva L.P., Gamzatova A., Kolbasin L.N., Nurgalieva L.R., Sikora N.V., Fedotova T.V., Tsygankova P.G., Ivanova O.N., Nazarenko Y.D., Pchelina S.N., Zakharova E.Y. Clinical and genetic characteristics of glutaric aciduria type 2 patients identified during the expanded neonatal screening program in the Russian Federation. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]*. 2024; 23(9): 18-31. (In Russ.)

Corresponding author: Zakharova E.Y.; e-mail: doctor.zakharova@gmail.com

Funding. The research was carried out within the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation for RCMG.

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

Accepted: 12.08.2024

Введение

Глутаровая ацидурия 2 типа (ГА2) или множественная недостаточность ацил-КоА-дегидрогеназ (MADD, OMIM 231680) – редкое жизнеугрожающее аутосомное-рецессивное заболевание, связанное с нарушением метаболизма жирных кислот и аминокислот. Данное заболевание относится к группе нарушений митохондриального β -окисления жирных кислот. Частота встречаемости ГА2 в мире составляет 1:15000-1:2000000 живых новорожденных [1].

Патогенез заболевания связан с дефицитом флавопротеина (ETF, электронпереносащий флавопротеин) или недостаточной активностью убихинон-оксидоредуктазы (ETF-QO). Данные белки участвуют в переносе электронов в качестве акцепторов и связывают окисление жирных кислот с окислительным фосфорилированием в митохондриях [2]. Невозможность окислять жирные кислоты также препятствует синтезу кетонных тел, которые являются важным источником энергии для головного мозга [3].

ETF – гетеродимер, состоящий из альфа- и бета-субъединиц (ETF α и ETF β), которые кодируются генами *ETF α* и *ETF β* . ETF располагается в матриксе митохондрий и участвует в переносе электронов от ряда ацил-КоА-дегидрогеназ к дыхательной цепи.

ETF-QO локализован на внутренней мембране митохондрий и является электронпереносащей флавопротеиндегидрогеназой, которая катализирует перенос электронов от ETF к убихинону. ETF-QO кодируется геном *ETFDH*. Для нормальной функции ETF и ETF-QO необходим кофермент флавинадениндинуклеотид (FAD), образующийся в организме в результате метаболизма рибофлавина (витамина B2).

Патогенные варианты в генах *ETF α* , *ETF β* и *ETFDH* влияют на сборку белков или нарушают каталитическую активность комплекса EFT/ETF-QO и его взаимодействие с дегидрогеназами. В белке ETF α выделяют два «горячих» участка: один участвует во взаимодействии с бета-субъединицей ETF β , другой – с кофактором FAD и среднепечочной ацил-КоА-дегидрогеназой. В бета-субъединице ETF β выделяют три важных участка: регион взаимодействия с кофактором, регион взаимодействия с другой субъединицей и регион, который участвует в переносе электронов [4]. ETF-QO характеризуется наличием трех доменов, а именно FAD-домена, связывающего FAD, UQ-bd-домена, связывающего убихинон, и 4Fe4S – железосерного кластера. В норме происходит перенос электронов, образующихся в результате дегидрогеназных реакций,

от комплекса ETF на железосерный кластер ETF-QO и далее на FAD, который является донором электронов для убихинона. Мутации в гене *ETFDH* часто локализованы именно в FAD-связывающем домене, затрудняя связывание флавопротеиндегидрогеназы с FAD.

Выделяют три клинические формы ГА2: неонатальную форму с врожденными аномалиями, неонатальную форму без врожденных аномалий и позднюю форму, которая может манифестировать как в детском возрасте, так и у взрослых.

Для неонатальных форм характерны тяжелый метаболический ацидоз, некетоцическая гипогликемия, гипераммониемия, мышечная гипотония, респираторный дистресс-синдромом или Рейе-подобный синдром, гепатомегалия, нефромегалия, кардиомиопатия; отмечают специфический запах от тела («сыра» или «потных ног») [2]. При неонатальной форме с врожденными пороками развития описаны краниофациальные дисморфии (высокий лоб, гипертелоризм, низко посаженные ушные раковины), мышечные дефекты передней брюшной стенки, гипоспадия. Течение поздней формы ГА2 волнообразное. Клинические проявления включают мышечную слабость, крампи, непереносимость физической нагрузки, эпизоды рвоты, гипогликемию, гепатомегалию, развитию которых часто предшествует метаболический криз [5].

Основным лабораторным методом диагностики ГА2 является анализ профиля ацилкарнитинов в пятнах крови методом тандемной масс-спектрометрии (ТМС). У пациентов с ГА2 наблюдается повышение концентрации ряда ацилкарнитинов (C4-C18) в крови.

При анализе органических кислот мочи методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией (ГХ-МС) выявляют повышение уровней глутаровой, этилмалоновой, адипиновой, субериновой, 2-гидроксиглутаровой кислот, а также изовалерилглицина и изобутирилглицина. При более легкой форме ГА2 характерные биохимические изменения могут проявляться только во время острого метаболического криза.

Для подтверждения диагноза молекулярно-генетическими методами проводят исследование кодирующей области генов *ETF α* , *ETF β* и *ETFDH*.

В то время как тяжелые неонатальные формы ГА2 в настоящее время неизлечимы, более мягкие при своевременной коррекции могут протекать бессимптомно [6]. Основным методом лечения ГА2 является диетотерапия. С целью коррекции метаболических нарушений пациентам назначается диета с ограничением жиров и белка (снижение избыточного потребления изолейцина, лейцина, лизина, триптофана и валина). Меди-

каментозное лечение включает прием L-карнитина, коэнзима-Q10 и рибофлавина. Также важно ограничить тяжелую физическую нагрузку и исключить голодание. В настоящее время считается, что чувствительность к терапии рибофлавином определяется преимущественно патогенными вариантами в гене *ETFDH* [7, 8]. Критичным для эффективного лечения симптомов ГА2 при терапии рибофлавином является раннее выявление заболевания.

С 1 января 2023 года в Российской Федерации проводится расширенный неонатальный скрининг (НЭС), позволяющий выявлять у новорожденных 36 наследственных нозологий. Включение ГА2 в программу НЭС обусловлено несколькими факторами: относительной распространенностью заболевания (примерно 1:200000 живых новорожденных согласно мировым данным [1]); сложностью постановки диагноза по клиническим проявлениям и необходимостью дифференцировать данную патологию с другими заболеваниями; возможностью коррекции симптомов заболевания при поздних или более мягких формах ГА2, так как в некоторых случаях в диете нет необходимости при его раннем выявлении [6]. В настоящее время ГА2 включена в программы неонатального скрининга в ряде стран, в частности в Китае, Италии, Швеции, Португалии и т.д. [9, 10].

Следует отметить ограниченность наших знаний о генофенотипических корреляциях при ГА2, необходимых как для прогноза развития патологии, так и для выбора тактики лечения. Так, есть предположение о том, что при наличии мутаций в *FAD*-связывающем домене наиболее эффективной является терапия рибофлавином [11].

За первый год программа НЭС в Российской Федерации позволила выявить 6 пациентов с ГА2. В данной статье приведены клинические, биохимические и молекулярно-генетические характеристики пациентов с ГА2, выявленных при проведении НЭС в Российской Федерации в 2023 г.

Пациенты и методы

При проведении НЭС было проведено обследование 1231401 новорожденного, родившегося в Российской Федерации с января по декабрь 2023 года; уровень охвата составил 98,03% [12]. Забор крови на тест-бланки осуществлялся на 24–48 час жизни у доношенных новорожденных и на 144–168 час жизни у недоношенных. Тест-бланк направлялся в одну из 10 медицинских организаций, относящихся к ведению субъектов РФ и осуществляющих программу НЭС, для первичного обследо-

вания методом ТМС (QSight 225MD UHPLC Screening System, набором NeoBase 2 (Perkin Elmer, Финляндия) в течение 72 часов с момента забора крови. На первом этапе (первичный скрининг) в крови проводилось определение концентрации ряда аминокислот (5-Oxo Pro, Ala, Arg, Asp, Cit, Cys, Glu, Gly, Hcy, His, Leu, Met, Orn, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val), ацилкарнитинов и соотношений метаболитов (C0, C10, C10:1, C10:2, C10DC, C12, C12:1, C12DC, C14, C14:1, C14:2, C14OH, C16, C16:1, C16:1OH, C16OH, C18, C18:1, C18:1OH, C18:2, C18OH, C2, C3, C3DC, C4, C4DC, C4OH, C5, C5:1, C5DC, C5OH, C6, C6DC, C6OH, C8, C8:1, C8DC, 3-OMD, SuAc, (C14+C14:1+C16:1)/C0, (C16+C18:1)/C2, C0/(C16+C18), C14:1/C12:1, C14:1/C16, C14:1/C2, C3/C0, C3/C2, C3/Met, HADHA (C16OH + C18OH + C18:1OH)/C0), MCAD, Met/Phe, Phe/Tyr) методом ТМС.

При выявлении отклонений при первичном скрининге на втором этапе НЭС проводили подтверждающую биохимическую и молекулярно-генетическую диагностику в ФГБНУ МГНЦ (г. Москва), который выполняет функции референсного центра в РФ в рамках программы НЭС.

Подтверждающая диагностика включала повторное исследование концентрации ряда аминокислот и спектра ацилкарнитинов в крови методом ТМС (ре-тест) (QSight 225MD UHPLC Screening System, набор NeoBase2, Perkin Elmer, Финляндия), а также первичное определение уровня органических кислот (2-гидроксиизовалериановая, 3-гидроксиглутаровая, 3-гидроксиизовалериановая, 3-гидроксипропионовая, 3-метилкротонилглицин, глутаровая, изовалерилглицин, метилмалоновая, оротовая, пропионилглицин, тиглилглицин, этилмалоновая) в моче методом ГХ-МС (GC MS-EI 8050 EI, SHIMADZU) и молекулярно-генетическую диагностику, включающую исследование кодирующей области генов *ETFA*, *ETFB* и *ETFDH* методом секвенирования нового поколения (NGS, MiSeq, Illumina). В целевую панель NGS входили гены, ассоциированные с наследственными болезнями обмена веществ, включая гены, ассоциированные с развитием ГА2. Референсные транскрипты генов, в которых выявлены изменения у пациентов: *ETFA* (NM_000126.4), *ETFDH* (NM_004453.4). Классификация вариантов нуклеотидной последовательности проводилась с использованием критериев American College of Medical Genetics (ACMG), адаптированных Рыжковой с соавт. [13]. Биоинформатический анализ 3D-визуализации ранее не описанных вариантов проводился с помощью веб-инструмента HOPE.

За данный период (январь—декабрь 2023 г.) на подтверждающую диагностику в ФГБНУ МГНЦ поступило 27 образцов с профилем ацилкарнитинов крови, характерным для ГА2: у пациентов наблюдалось повышение более двух ацилкарнитинов (С4–С12) одновременно.

Родители или законные представители всех пациентов подписали добровольное информированное согласие на проведение подтверждающей диагностики, на участие в научном исследовании и также на использование и публикацию их медицинских данных (результатов обследования, лечения и наблюдения).

Работа была проведена в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ МГНЦ (номер 2015–5/3, дата 2015.05.03).

Результаты

По результатам исследований в рамках РНС в 2023 г. на первом этапе была сформирована группа для подтверждающей диагностики (27 новорожденных). У пациентов данной группы был осуществлен повторный забор крови на тест–бланки, мочи и цельной крови для проведения подтверждающей биохимической и молекулярно-генетической диагностики. При повторном анализе спектра ацилкарнитинов крови (ретест) у 21 пациента из 27 диагноз ГА2 не был подтвержден, т.е. спектр аминокислот и ацилкарнитинов был в пределах референсных значений. Если был предоставлен образец мочи, пациентам также проводился анализ органических кислот мочи, результаты которого были также в пределах референсных значений. На молекулярно-генетический этап подтверждающей диагностики направлялись пациенты с повышенным уровнем ацилкарнитинов крови (по результатам первичного и повторного тестов), не опираясь на анализ органических кислот мочи, поскольку известны случаи их нормального спектра у пациентов с ГА2 [6] и, следовательно, данный анализ не обладает большой диагностической значимостью.

Итого по результатам подтверждающей диагностики в рамках РНС за 2023 г. было выявлено 6 пациентов с ГА2. Частота ГА2 в Российской Федерации составила 1:205233 живых новорожденных (95% ДИ: 1:106129 – 396882 живых новорожденных по Уилсону). Диагноз был установлен пациентам, проживающим в Ханты-Мансийском автономном округе, Хабаровском крае, Воронежской и Саратовской областях, Республиках Дагестан и Башкортостан.

Анализ ацилкарнитинов крови

По результатам первичного скрининга (24–48 часов) концентрации ацилкарнитинов С6, С10, С12, С14, С14:1 крови были повышены у всех шести пациентов (6/6); С8 – у четырех пациентов (4/6); С5, С4, С16:1 – у двух пациентов (2/6).

При повторном анализе концентрации ацилкарнитинов в крови на 7–40 сутки жизни от момента рождения у пациентов наблюдалось повышение концентрации С8 в диапазоне от 0,532 до 0,863 мкМ/л (норма <0,500 мкМ/л), показатель С10 варьировал от 0,464 до 0,831 мкМ/л (норма <0,430 мкМ/л), С14 – от 0,662 до 1,442 мкМ/л (норма <0,555 мкМ/л), С14:1 – от 0,452 до 1,171 мкМ/л (норма <0,380 мкМ/л). Повышение концентрации С12 наблюдалось у всех шести пациентов, значение колебалось в интервале 0,388–1,130 мкМ/л (норма <0,350 мкМ/л) (табл. 1). Динамика уровня ацилкарнитинов крови при первичном и повторном скринингах представлена на рис. 1.

Клинические проявления

Клинические симптомы на момент скрининга наблюдались у трех детей (3/6): отмечались гипогликемия, нарушение дыхания, мышечная гипотония (табл. 2). Особенности фенотипа, множественных врожденных пороков развития отмечено не было. В семье пациента 2 старший sibс умер в возрасте 3 суток жизни, обследование не проводилось. В исследуемой выборке у четырех пациентов наблюдались различные неврологические нарушения: энцефалитоподобные кризы (пациент 3), множественные кисты в головном мозге (пациент 2), церебральная ишемия (пациенты 4 и 6). У двух пациентов были выявлены изменения в почках. У пациентов 2 и 3 наблюдались дыхательные и неврологические нарушения. В нескольких исследованиях дыхательная недостаточность присутствовала у пациентов с поздней формой ГА2.

Двое детей (пациенты 1 и 6) ни в период новорожденности, ни на момент сбора данных (1,3 года и 4 мес соответственно) не имели клинических проявлений. Всем пациентам были назначены диетотерапия, рибофлавин, однако два случая (пациенты 3 и 5) закончились смертельным исходом в возрасте 1 год 2 месяца и 2,5 месяца соответственно. Также у пациента 3 при рождении отмечалось тяжелое состояние, которое было обусловлено недоношенностью (34/3 недели).

Анализ органических кислот мочи

При анализе органических кислот мочи методом ГХ-МС у четырех пациентов было выявлено повышение концентрации глutarовой кислоты в интервале от 26,23 до 384,6 ммоль/моль креатинина (норма <17,00 ммоль/моль креатинина); повышение концентрации изовалерилглицина – у 4 пациентов в интер-

вале от 4,61 до 22,22 ммоль/моль креатинина (норма <0,40 ммоль/моль креатинина); повышение концентрации этилмалоновой кислоты – у 3 пациентов в интервале от 44,6 до 313,46 ммоль/моль креатинина (норма <29,00 ммоль/моль креатинина). У одного пациента спектр органических кислот мочи был в пределах референсных значений (пациент 6). Одному пациенту (пациент 3) анализ не проводился (табл. 2).

Таблица 1. Концентрация ацилкарнитинов крови у пациентов с ГА2 по первичным результатам РНС и по результатам подтверждающей диагностики

Table 1. Blood acylcarnitine concentrations in patients with GA2 according to primary results of neonatal screening and confirmatory diagnostics

Ацилкарнитины	Пациент 1		Пациент 2		Пациент 3		Пациент 4		Пациент 5		Пациент 6	
	Первичный тест (на 3 с/ж)	Подтверждающий тест (на 21 с/ж)	Первичный тест (на 3 с/ж)	Подтверждающий тест (на 11 с/ж)	Первичный тест (на 8 с/ж)	Подтверждающий тест (на 40 с/ж)	Первичный тест (на 2 с/ж)	Подтверждающий тест (на 24 с/ж)	Первичный тест (на 2 с/ж)	Подтверждающий тест (на 7 с/ж)	Первичный тест (на 8 с/ж)	Подтверждающий тест (на 22 с/ж)
C0 (РД: 8,00-190,00 мкМ/л)	20,32	21,368	16,8	25,66	24,444	20,631	29,4	28,189	25,747	18,122	17,6	24,417
C3 (РД: 0,1300-7,40 мкМ/л)	0,39	0,419	2,51	0,726	0,552	0,439	0,76	0,525	3,515	1,019	2,48	1,223
C4 (РД:0-1,300 мкМ/л)	н/д	1,168	3,7	2,196	0,63	0,688	0,43	0,628	1,8	0,618	0,37	0,237
C5 (РД: 0-1,000 мкМ/л)	0,86	2,49	2,1	2,123	0,835	0,314	1,0	0,678	1,2	0,542	0,12	0,132
C6 (РД: 0-0,350 мкМ/л)	0,511	0,744	1,29	0,168	0,523	0,438	0,33	0,434	1,2	0,322	0,2	0,126
C8 (РД: 0-0,500 мкМ/л)	1,046	0,863	2,1	0,225	0,825	0,536	0,41	0,553	2,7	0,532	0,48	0,257
C10 (РД: 0-0,430 мкМ/л)	1,238	0,735	1,52	0,299	1	0,831	0,56	0,684	1,8	0,677	0,97	0,464
C12 (РД: 0-0,350 мкМ/л)	2,057	1,057	2,52	0,494	0,862	0,888	0,50	0,454	2	1,13	1,34	0,388
C14 (РД: 0-0,555 мкМ/л)	1,593	1,422	3,81	0,864	0,652	1,05	0,57	0,662	2,2	0,969	0,8	0,315
C14:1 (РД: 0-0,380 мкМ/л)	1,205	1,171	1,87	0,452	0,515	0,969	0,40	0,56	1,7	0,83	0,81	0,161
C16:1 (РД: 0-0,540 мкМ/л)	1,169	1,2	1,61	0,41	0,418	0,727	0,35	0,39	1,28	0,716	н/д	0,083
ГА2-индекс (<0,005)	-	0,399	1,474	0,049	0,021	0,013	0,0045	0,011	0,148	0,009	0,0004	0,00008

Примечание: РД – референсный диапазон. Отклонения от референсных значений выделены полужирным начертанием; ГА2-индекс – [$C4 \times C5 \times C8 \times C14$]/[$C0 \times C3$]; н/д – нет данных (не определяли).

Молекулярно-генетическая диагностика

У всех пациентов диагноз ГА2 был подтвержден на молекулярно-генетическом уровне. У большинства (N=5) пациентов были обнаружены однонуклеотидные варианты в гене *ETFDH* (5/6) (табл. 2). Ранее описанный вариант с.652G>A (p.Asp218Asn) в экзоне 6 гена *ETFDH* был обнаружен у двух новорожденных в гомозиготном состоянии (пациенты 2 и 3). Данный вариант неоднократно описан в международных базах данных по мутациям человека The Human Gene Mutation Database (HGMD) (CM024520), ClinVar (1519714). Согласно критериям ACMG, вариант является патогенным (PM3, PM2, PP3, PP2, PP5). У пациента 5 был обнаружен описанный в базе ClinVar (1977356) вариант с.1400G>A (p.Gly467Glu) в экзоне 11 гена *ETFDH* в гомозиготном состоянии, приводящий к миссенс-замене и являющийся патогенным согласно критериям ACMG (PM3, PM2, PP5, PP2, PP5). В гене *ETFDH* были также обнаружены ранее описанная делеция с.36delA (p.Tyr13fs) (HGMD: CD031833) в экзоне 2, миссенс-замена с.731T>C (p.Phe244Ser) (HGMD: CM088128) в экзоне 7, а также ранее опи-

санная миссенс-замена с.1367C>T (p.Pro456Leu) (HGMD: CM024526) в экзоне 11. Локализация выявленных аминокислотных замен ETF-QO приведена на схематическом рисунке доменной организации фермента (рис. 2А). Следует отметить, что функциональные домены формируются при 3D-сборке ETF-QO. Трехмерное представление функциональных доменов фермента представлено на рис. 2Б.

У одного пациента (пациент 1) были обнаружены ранее не описанные нуклеотидные варианты в экзонах 2 и 9 гена *ETFA*: вариант неясного значения с.127G>A (p.Ala43Thr) и с.791G>A (p.Gly264Glu) – вероятно патогенный. Образцы ДНК родителей для анализа носительства выявленных вариантов предоставлены не были.

Обсуждение

В ходе РНС в период за 2023 г. было выявлено 6 пациентов с ГА2. Забор биоматериала (кровь, моча) для подтверждающей диагностики у данных пациентов осуществлялся на 7-40 сутки жизни.

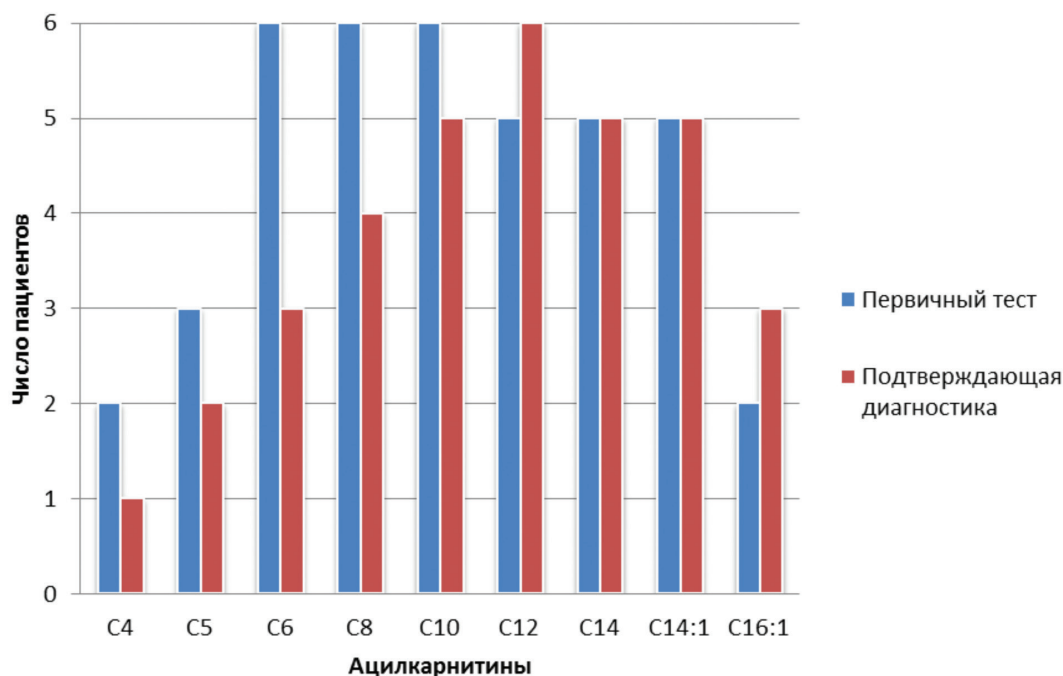


Рис. 1. Сравнение числа пациентов, имеющих повышение концентрации ацилкарнитинов при первичных результатах РНС и при подтверждающей диагностике

Fig. 1. Comparison of the number of patients with elevated acylcarnitine concentrations in the initial neonatal screening results and in confirmatory diagnostics

Таблица 2. Клинико-генетические особенности пациентов с ГА2.**Table 2.** Clinical and genetic characteristics of patients with GA2.

№	Пол	Концентрация органических кислот мочи (ммоль/моль креатинина)	Генотип	Клинические проявления
1	Ж	Глутаровая: 12,25 Изовалерилглицин: 22,22 Этилмалоновая: 44,6	<i>ETFA</i> [c.127G>A (p.Ala43Thr); c.791G>A (p.Gly264Glu)]	Роды на 40 нед. (3680 г, 53 см). Неонатальный период – б/о. На 2 м/ж – киста правой почки. Физическое развитие в соответствии с возрастом.
2	М	Глутаровая: 26,23 Изовалерилглицин: 20,84	<i>ETFDH</i> [c.652G>A (p.Asp218Asn); c.652G>A (p.Asp218Asn)]	Роды на 39 нед. (3060 г, 52 см). На 2 с/ж вялость, отказ от еды, остановка дыхания, гипогликемия, криз купирован введением декстрозы. С 19 с/ж получает терапию рибофлавином. Множественные кисты в ГМ. Фенотип – б/о. Сибс (2022 г.р.): на 2 с/ж отказ от еды, вялость, остановка дыхания, смертельный исход.
3	М	Анализ не проводился	<i>ETFDH</i> [c.652G>A (p.Asp218Asn); c.652G>A (p.Asp218Asn)]	Недоношенный (экстренное КС на 34 нед. по поводу отслойки плаценты, 2255 г, 45 см). Ребенок от близкородственного брака. С рождения дыхательная недостаточность, тахипноэ, угнетение сознания, неонатальная желтуха. стабилизация состояния на фоне инфузионной терапии, выписан домой. Рекомендации по терапии не соблюдает. В 4,5 месяца: задержка психомоторного развития, дыхательные нарушения, отказ от еды, синдром холестаза, железодефицитная анемия, ретинопатия. Фенотип б/о. В 1 г 2 мес. смертельный исход. Сибс от 1-й беременности – задержка психоречевого развития.
4	Ж	Глутаровая: 315,77 Изовалерилглицин: 12,14 Этилмалоновая: 313,46	<i>ETFDH</i> [c.36delA (p.Tyr13fs); c.731T>C (p.Phe244Ser)]	Роды на 40-41 нед. (3180 г, 50 см). На 2 с/ж гипогликемия (1,8 ммоль/л). С 4 с/ж переведен в ОПН: состояние средней степени тяжести, неонатальная желтуха, синдром угнетения ЦНС, синдром вегето-висцеральных нарушений, инфекция мочевых путей, тромб в воротной вене; снижение мышечного тонуса, гепатомегалия. На 9 с/ж – объемная перегрузка правого предсердия, гипертрофия МЖП (минимальная), НТК 1 ст. МР-признаки гипоксического ишемического повреждения ГМ, подострая стадия. В 12 мес – дилатация боковых желудочков по результатам НСГ; психоречевое и психомоторное развитие по возрасту, тонус мышц диффузно снижен. Фенотип б/о. Сибсы от 1-й и 2-й беременностей здоровы.
5	М	Глутаровая: 384,3 Изовалерилглицин: 4,61 Этилмалоновая: 173,29	<i>ETFDH</i> [c.1400G>A (p.Gly467Glu); c.1400G>A (p.Gly467Glu)]	Роды на 42 нед. (3950 г, 54 см). Ребенок от близкородственного брака. Фенотип б/о. Развивался по возрасту, жалоб не было. В 2,5 мес. смертельный исход. Сибс от 1-й беременности здоров.
6	Ж	В пределах референсных значений	<i>ETFDH</i> [c.1367C>T (p.Pro456Leu); c.1367C>T (p.Pro456Leu)]	Роды на 40 нед. (2900 г, 51 см). Период новорожденности б/о. На 48 с/ж гипоксические изменения ГМ, ООО 3 мм. На 56 с/ж – повышение печеночных трансаминаз. Развивается по возрасту, жалоб нет.

Примечание: референсные диапазоны органических кислот мочи: глутаровая кислота – 0-17,00 ммоль/моль креатинина; изовалерилглицин – 0-0,40 ммоль/моль креатинина; этилмалоновая кислота – 0-29,00 ммоль/моль креатинина; 3-гидроксиизовалериановая кислота – 0-65,00 ммоль/моль креатинина. Сокращения: б/о – без особенностей, ГМ – головной мозг, н/д – нет данных, МЖП – межжелудочковая перегородка, НТК – недостаточность трехстворчатого клапана, с/ж – сутки жизни, м/ж – месяц жизни, ЭОС – электрическая ось сердца, ↑ – повышение уровня/увеличение. Ранее не описанные нуклеотидные варианты выделены полужирным начертанием.

Ранее в ФГБНУ МГНЦ проводился селективный скрининг на наследственные болезни обмена веществ, в результате которого в период с 2014 по 2024 годы было выявлено 10 пациентов с ГА2 из 9 семей. Одному пациенту диагноз был установлен на основании биохимических данных (молекулярно-генетическая диагностика не проводилась вследствие отсутствия биоматериала). Также стоит отметить, что 2 случая из 10 закончились смертельным исходом в возрасте 4 месяцев и в младенчестве (точный возраст неизвестен). Стоит отметить, что варианты, выявленные у двух вышеупомянутых пациентов, не были обнаружены в выборке пациентов с ГА2 по результатам РНС: у данных па-

циентов были обнаружены ранее описанные варианты в гене *ETF A* в компаунд-гетерозиготном состоянии (NM_000126:c.470T>G (p.Val157Gly) и NM_000126:c.667C>T (p.Arg223*)) и ранее описанные варианты в гене *ETF DH* также в компаунд-гетерозиготном состоянии (NM_004453:c.1130T>C (p.Leu377Pro) и NM_004453:c.1200_1203delTCAC (p.His401Glnfs*3) (неопубликованные данные). Таким образом, следует отметить очевидную низкую выявляемость ГА2 до введения программы РНС.

ГА2 входит в программу РНС во многих странах Европы (Австрия, Бельгия, Финляндия, Венгрия, Италия), а также в США и Китае [9, 10]. Частота заболевания значительно варьирует в разных странах.

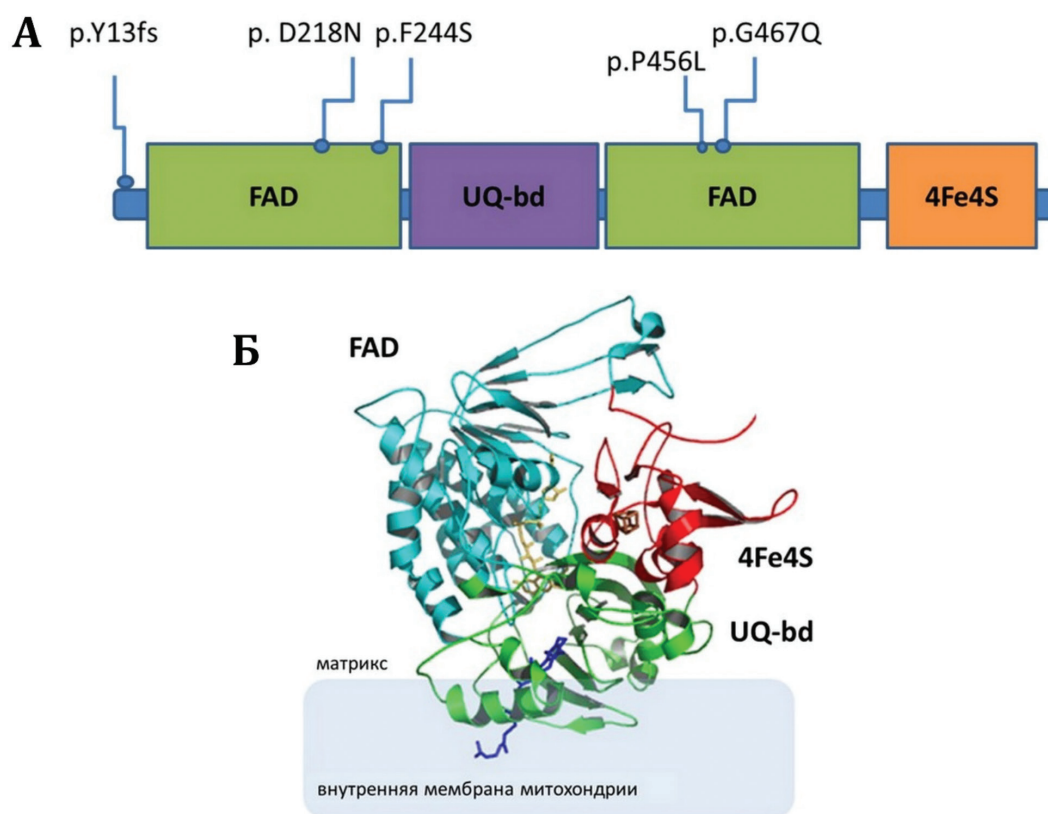


Рис. 2. А. Схематическое изображение ETF-QO с обозначением функциональных доменов и распределением найденных вариантов. Домены ETF-QO: FAD – домен, связывающий флавинадениндуклеотид (FAD); UQ-bd – домен, связывающий убиквинон; 4Fe4S – железосерный кластер. Б. 3D-визуализация доменной структуры ETF-QO. Голубым цветом выделен домен FAD, зеленым – домен UQ-bd, красным – 4Fe4S [20].

Fig. 2. A. Schematic representation of ETF-QO with designation of functional domains and distribution of found variants. ETF-QO domains: FAD – flavin adenine dinucleotide (FAD)-binding domain; UQ-bd – ubiquinone-binding domain; 4Fe4S – iron-sulfur cluster. Б. 3D visualization of the domain structure of ETF-QO. The FAD domain is highlighted in blue, the UQ-bd domain in green, and 4Fe4S in red [20].

Так, в США частота составляет 1:378272 живых новорожденных, в Австралии – 1:2000000, а в Турции – 1:15000 [1]. В Китае частота неонатальной ГА2 составляет примерно 1:32180 [1]. Частота ГА2 в Российской Федерации составила 1:205233 живых новорожденных (95% ДИ: 1:106129–396882 по Уилсону), что близко к странам Европы и США.

В нашем исследовании не выявлено этнических или региональных особенностей распределения заболевания. Одной из сложностей точной диагностики являлось отсутствие точных отрезных точек и референсных значений для оцениваемых метаболитов крови у новорожденных при РНС. Референсные диапазоны концентрации ацилкарнитинов крови у новорожденных, измеряемые методом ТМС, варьируются в различных странах (табл. 3).

В группу риска по ГА2 были включены пациенты с множественным повышением уровня ацилкарнитинов в крови, которое при этом не является патогномичным для других нарушений β -окисления жирных кислот, например, дефицита ацил-КоА дегидрогеназы жирных кислот с очень длинной углеродной цепью (VLCADD) или дефицита ацил-КоА-дегидрогеназы среднецепочечных жирных кислот (MCAD).

В США при проведении неонатального скрининга применяется соотношение $[C4 \times C5 \times C8 \times C14] / [C0 \times C3]$ – ГА2-индекс. Так, при повышении двух или более ацилкарнитинов вкуче с повышением ГА2-индекса $\geq 0,005$ пациент попадает в группу очень высокого риска ГА2, а при повышении двух или более ацилкарнитинов вкуче с ГА2-индексом $< 0,005$ – в группу высокого риска. При этом, чем выше данный индекс, тем выше вероятность выявления ГА2. Согласно исследованию [9], используя ГА2-индекс и основываясь исключительно на концентрации ацилкарнитинов в крови пациентов, можно предположить, обусловлен ли данный случай носительством варианта в генах ГА2,

дефицитом рибофлавина у матери или же высоко вероятным диагнозом ГА2.

В нашей выборке данное соотношение ($[C4 \times C5 \times C8 \times C14] / [C0 \times C3]$) было повышено у всех пациентов за исключением одного (пациент 6), то есть 5 из 6 пациентов входят в группу очень высокого риска (табл. 1). Суммируя полученные данные, введение ГА2-индекса, который в настоящее время не используется при проведении неонатального скрининга на ГА2, может помочь в постановке диагноза, если по определенным причинам ДНК-исследование или дополнительная биохимическая диагностика, например, исследование активности фермента, недоступны.

Следует отметить, что наличие и тяжесть клинических симптомов в нашей выборке не коррелирует с уровнем повышения ГА2-индекса: его уровень был повышен как у пациентов с тяжелыми симптомами (пациенты 2, 3 и 4), так и без (пациенты 1 и 5). Однако интересно, что у пациента 4 по результатам первичного теста (на 2 с/ж) ГА2-индекс был в пределах референсных значений, но при повторном тесте (на 24 с/ж через 22 дня) при подтверждающей диагностике ГА2-индекс повысился. Возможно, это объясняется развитием тяжелых симптомов после 2 с/ж. Таким образом, для дальнейшего применения на практике данного индекса необходимо исследование его динамики.

Пациент 6 входит в группу высокого риска: при проведении подтверждающей диагностики у него наблюдалось незначительное повышение исключительно C10 и C12, в то время как уровень других ацилкарнитинов крови был в пределах нормы. При проведении ретеста при подтверждающей диагностике практически у всех пациентов концентрации коротко- и среднецепочечных ацилкарнитинов крови была ниже, чем при первичном анализе методом ТМС (даже в отсутствии специальной терапии). В литературе описаны похожие случаи, когда концентрация ацилкарнитинов крови

Таблица 3. Диапазоны концентрации ацилкарнитинов крови у новорожденных в различных странах.

Table 3. Ranges of blood acylcarnitine concentrations in newborns in different countries.

	C4	C5	C6	C8	C10	C12	C14	C14:1	C16
Южный Китай	0,08-0,5	0,03-0,35	0,01-0,09	0,01-0,15	0,02-0,2	0,01-0,24	0,02-0,37	0,02-0,26	н/д
Восточный Китай (г. Чжэцзян)	0,03-0,48	0,01-0,40	0,03-0,17	0,02-0,17	0,03-0,22	0,03-0,28	0,07-0,40	0,03-0,26	0,49-6,00
ОАЭ	0-0,83	0-0,51	0-0,17	0-0,78	0-0,88	0-0,26	0-0,12	0-0,24	0-0,23
Россия	0-1,3	0-1	0-0,35	0-0,5	0-0,43	0-0,35	0-0,555	0-0,38	0,3-8,5

Примечание: значения в таблице указаны в мкМ/л. Н/д – нет данных.

пациента при повторном анализе методом ТМС была в пределах референсных значений. Такие случаи ассоциировались, как правило, с мягкими формами ГА2 [14]. Данная особенность мягких форм может привести к ложноотрицательным результатам и, следовательно, к недиагностированным случаям ГА2. Применение ГА2-индекса может быть полезно в подобных неоднозначных случаях, как, например, у пациентов 1 и 5.

Известно, что некоторые митохондриальные заболевания могут имитировать нарушения митохондриального β -окисления жирных кислот, и это может приводить к ложноположительным результатам. Более того, схожий с ГА2 профиль ацилкарнитинов крови может наблюдаться у младенцев, которые получают внутривенные жировые эмульсии. Интересно, что аномальный профиль ацилкарнитинов крови может наблюдаться у здоровых носителей ГА2 и даже при дефиците рибофлавина у матери.

При подтверждающей диагностике РНС также проводилось определение концентрации органических кислот мочи. У пациентов с ГА2 описаны случаи изолированного повышения отдельных органических кислот, таких как глутаровая и этилмалоновая кислоты. У 4 из 5 пациентов (пациенту 3 данный анализ не проводился) наблюдалась классическая картина спектра органических кислот мочи при ГА2. Однако у пациента 6 концентрация органических кислот находилась в пределах нормы, что может объясняться более мягкой формой ГА2 (клинические симптомы ГА2 на момент рождения отсутствовали). В спектре органических кислот мочи у пациентов с мягкой формой ГА2 может отмечаться незначительное повышение дикарбоновых кислот исключительно в период криза, в отличие от полностью асимптоматичных пациентов. Тем не менее, анализ органических кислот мочи не является основным для постановки окончательного диагноза.

Диагноз ГА2 на молекулярно-генетическом уровне подтвержден всем 6 пациентам. У пяти пациентов из исследуемой выборки выявлены биаллельные варианты в гене *ETFDH*. Известно, что варианты в гене *ETFDH*, в основном, ассоциированы с поздним началом заболевания [5]. Симптомы манифестации сильно варьируют и характеризуются гипогликемией, метаболическим ацидозом, гипераммониемией, миопатией, гепатомегалией. Провоцирующими факторами могут выступать различные инфекции, оперативные вмешательства, терапия вальпроатами.

У двух пациентов был выявлен вариант с.652G>A (p.Asp218Asn) в гене *ETFDH* в гомозиготном состоянии. Этот вариант описан в базе данных по мутациям чело-

века HGMD как патогенный. Согласно данным The Genome Aggregation Database (gnomAD) популяционная частота данного варианта составляет 0,000005613. Ранее данный вариант не был описан в гомозиготном состоянии: он был выявлен у новорожденного из Чикаго при неонатальном скрининге в сочетании с вариантом с.1852T>C (p.X618Gln) [15], у другого новорожденного – в компаунд-гетерозиготном состоянии с вариантом с.51_52insT (p.A18*fs22), а также у пациента шести лет в компаунд-гетерозиготном состоянии с вариантом с.245C>T (p.Ser82Phe) [16]. У двух последних пациентов отмечалось более легкое течение болезни, чем у пациентов в нашей выборке, что, вероятно, связано с носительством другого варианта во втором аллеле [16].

Интересно, что в данном исследовании вариант с.652G>A (p.Asp218Asn) был выявлен в двух неродственных семьях из Центрального региона России у пациентов с тяжелыми клиническими симптомами (пациенты 2 и 3) и смертельным исходом у пациента 3 в возрасте 1 год 2 месяца. Ранее в ФГБНУ МГНЦ при селективном скрининге была выявлена пара сибсов из цыганской семьи от близкородственного брака с вариантом с.652G>A (p.Asp218Asn) в гомозиготном состоянии (неопубликованные данные). Клиническая картина данной пары сибсов также отмечались тяжестью, заболевание у одного из них манифестировало в 4,5 месяца (у данного сибса отмечались гипогликемия, гипоксическая ишемическая энцефалопатия, легочная гипертензия 1 ст, ретинальные кровоизлияния), а у второго в 10 месяцев (данный сибс поступил с гипогликемической комой и судорожным синдромом, гиперсаливацией). Суммируя полученные нами результаты, можно сделать вывод об относительной распространенности мутации с.652G>A (p.Asp218Asn) в гене *ETFDH* в России и ее ассоциации с тяжелой неонатальной формой ГА2. Локализация данной мутации в FAD-связывающем домене (рис. 2) позволяет предположить, что данные формы заболевания могут быть чувствительны к терапии рибофлавином [8].

Также следует отметить, что пациент 6, у которого не наблюдалось клинических симптомов на момент исследования и не отмечалось повышение ГА-2 индекса, являлся гомозиготным носителем мутации с.1367C>T (p.Pro456Leu). Мутация локализуется в убиквинон-связывающем домене (UQ-bd) и влияет одновременно как на связь с убихиноном, так и на связывание с FAD [11]. Ранее при трансфекции клеточной культуры HEK-293 было показано, что данная замена, влияющая на сборку фермента, снижает скорость его встраивания во внутреннюю мембрану митохондрий, приводя к снижению

активности до 70% [3]. Вариант с.1367C>T (p.Pro456Leu) ранее был ассоциирован с рибофлавин-чувствительной формой ГА2 и мягким течением заболевания [3, 11].

У пациента 5 от близкородственного брака (сибс от 1-ой беременности здоров) был выявлен ранее описанный вариант с.1400G>A (p.Gly467Glu) в гене *ETFDH* в гомозиготном состоянии, приводящий к миссенс-замене (ClinVar 1977356). Данный вариант зарегистрирован в контрольной выборке gnomAD с частотой 0,000006848. Согласно критериям ACMG, вариант определен как патогенный (критерии PM2, PM5, PP2, PP3, PP5). Данный случай закончился смертельным исходом в возрасте 2,5 месяцев. Ранее этот вариант был описан в китайской семье в компаунд-гетерозиготном состоянии с вариантом с.409C>T (p.Pro137Ser): ГА2 у пациента манифестировала в 10 месяцев, у него отмечались множественные эпизоды некетолической гипогликемии и судороги [4].

У одного пациента (пациент 1) при молекулярно-генетическом анализе были выявлены два ранее не описанных варианта в гене *ETFA* в компаунд-гетерозиготном состоянии: с.127G>A (p.Ala43Thr) и с.791G>A (p.Gly264Glu) (табл. 4). Согласно критериям ACMG, первый вариант классифицирован как вариант неясного значения, второй – вероятно патогенный (критерии PM2 и PP3 с общим показателем score программ предсказания 0,849 и 0,987 соответственно). Согласно данным gnomAD популяционная частота обоих вариантов составляет 0,000003719 и 0,000001241 соответственно. Фенотип данного пациента без особенностей.

Следует отметить, что молекулярно-генетическое тестирование, направленное на выявление патогенных вариантов в кодирующей области генов *ETFA*, *ETFB*, *ETFDH*, хотя и помогает подтвердить диагноз ГА2 в ряде случаев, тем не менее не исключает наличие патогенных вариантов в других сайтах, например, в регуляторных областях генов или в глубине интронов [17].

Трое из шести пациентов имели клинические проявления на момент рождения, при этом двое из них имели вариант с.652G>A (p.Asp218Asn) в гене *ETFDH* в гомозиготном состоянии. Оба случая тяжелые. Так, в первом случае у пациента наблюдались вялость, отказ от еды, остановка дыхания, гипогликемия, множественные кисты в головном мозге; во втором – с рождения дыхательная недостаточность, тахипноэ, угнетение сознания, церебральная ишемия, неонатальная желтуха и после введения прикорма в 4,5 месяцев была госпитализация с диагнозом энцефалопатия, тонусные нарушения, энцефалитоподобный криз, холестатический гепатит умеренной активности, железодефицитная анемия.

В настоящее время известно о 200 патогенных вариантах в гене *ETFDH* [17], приводящих к развитию ГА2, однако четких генофенотипических корреляций на данный момент не установлено. Предполагается, что гомозиготные и компаундные нуль-варианты в гене *ETFDH* ассоциированы с тяжелым летальным фенотипом. Известно, что все пациенты с мягкими рибофлавин-чувствительными формами ГА2 имели хотя бы один аллель с миссенс-вариантом [3]. Считается, что миссенс-варианты в гене *ETFDH* ассоциированы с более поздним проявлением заболевания по сравнению с вариантами в гене *ETFB* [18]. При этом отмечается популяционная специфичность вариантов: один и тот же вариант редко встречается в различных популяциях [4, 17]. Как отмечалось выше, вариант с.652G>A (p.Asp218Asn) встречается редко и был ранее выявлен только в компаунд-гетерозиготном состоянии при тяжелом течении ГА2 у трех пациентов. Описанные нами тяжелые случаи ГА2 с гомозиготным носительством с.652G>A (p.Asp218Asn) *ETFDH* дают основание предположить ассоциацию аллеля с.652G>A (p.Asp218Asn) с тяжелой неонатальной формой ГА2.

Таблица 4. *In silico* анализ ранее не описанных вариантов

Table 4. *In silico* analysis of previously undescribed variants

Ген	Изменение нуклеотидной последовательности	Обозначение по белку	Консервативность	PolyPhen-2	Mutation taster	SIFT	Revel	Provean	Meta SVM
<i>ETFA</i>	с.127G>A	p.Ala43Thr	Высокая	Вероятно патогенный	Патогенный	Вероятно патогенный	-	-	-
<i>ETFA</i>	с.791G>A	p.Gly264Glu	Высокая	Вероятно патогенный	Патогенный	Вероятно патогенный	-	Вероятно патогенный	-

Заключение

Расширение программы неонатального скрининга позволяет проводить раннюю диагностику наследственных заболеваний, выявлять врожденные нарушения метаболизма до проявления первой симптоматики и своевременно оказывать медицинскую помощь для предотвращения развития тяжелых состояний.

По нашим наблюдениям определение органических кислот мочи не дает дополнительной информации о диагнозе ГА2 и данный этап в рамках алгоритма скрининга может быть исключен. Наличие возможных ложноположительных результатов при проведении анализа спектра аминокислот и ацилкарнитинов крови методом ТМС и снижение концентрации ряда ацилкарнитинов при повторном исследовании до уровня референсных значений указывает на то, что вторым этапом диагностики данного заболевания у всех пациентов должно быть ДНК-тестирование. Если патогенные варианты не обнаружены или выявлен только один вариант в гетерозиготном состоянии, требуется проведение расширенной диагностики, в том числе проведение полногеномного секвенирования, чтобы исключить или подтвердить наличие вариантов в глубине интронов, крупных делеций и других изменений, которые не выявляются методами таргетного секвенирования нового поколения.

Несмотря на то, что выявление пациентов в рамках РНС не всегда позволяет предотвратить развитие тяжелых осложнений, связанных с неонатальной формой ГА2, проведение ранней диагностики позволяет уже в неонатальном периоде поставить окончательный диагноз, что важно для медико-генетического консультирования семьи.

У пациентов нашей выборки с более легкими формами ГА2 в неонатальном периоде наблюдалась проходящая гипогликемия. Такие случаи транзиторной гипогликемии часто не принимаются во внимание врачами, поскольку они легко корректируются путём инфузионной терапии декстрозой. Однако данный симптом является одним из первых признаков многих нарушений обмена веществ, в том числе ГА2.

Остается немало открытых вопросов: насколько программа РНС позволяет предотвратить развитие острых кризов и перевести «острое заболевание» в «хроническую форму»? Выявляем ли мы в результате РНС биохимические варианты, которые не имеют физиологического значения или являются малозначительными? Эти вопросы могут быть решены только при совместных усилиях метаболических центров в прове-

дении долгосрочных исследований на пациентах, выявленных через скрининг новорожденных.

Кроме достижения основной цели скрининговых программ, а именно выявления и лечения детей с наследственными заболеваниями, опыт проведения неонатального скрининга в разных странах показывает, что подобные программы дают уникальную возможность как для уточнения распространенности заболевания или его конкретных форм в исследуемой популяции, так и для получения знаний о генофенотипических корреляциях.

Литература

1. Lindner M., Hoffmann G.F., Matern D. Newborn screening for disorders of fatty-acid oxidation: experience and recommendations from an expert meeting. *Journal of Inherited Metabolic Disease: Official Journal of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism*. 2010;33(5): 521-526.
2. Серебrenников В.Н., Бакшеев В.И., Серебренникова К.В. и др. Ультраредкая форма нарушения метаболизма жирных кислот у взрослых: клиническое наблюдение. *Медицинская генетика*. 2023;22(11): 58-64.
3. Cornelius N., Frerman F.E., Corydon T.J., et al. Molecular mechanisms of riboflavin responsiveness in patients with ETF-QO variations and multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency. *Human molecular genetics*. 2012;21(15): 3435-3448.
4. Fan X., Xie B., Zou J., et al. Novel ETFDH mutations in four cases of riboflavin responsive multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Molecular genetics and metabolism reports*. 2018;16: 15-19.
5. Grünert S.C. Clinical and genetical heterogeneity of late-onset multiple acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *Orphanet journal of rare diseases*. 2014;9: 1-8.
6. Prasad P. Multiple Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency. 2020. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaz GM, et al. (editors). *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle. 1993-2024.
7. Wen B., Tang R., Tang S., et al. A comparative study on riboflavin responsive multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency due to variants in FLAD1 and ETFDH gene. *Journal of Human Genetics*. 2024;69(3): 125-131.
8. Wen B., Tang S., Lv X., et al. Clinical, pathological and genetic features and follow-up of 110 patients with late-onset MADD: a single-center retrospective study. *Human molecular genetics*. 2022;31(7): 1115-1129.
9. Lin Y., Zhang W., Chen Z., et al. Newborn screening and molecular features of patients with multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency in Quanzhou, China. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*. 2021;34(5): 649-652.
10. Loeber J.G., Platis D., Zetterström R.H., et al. Neonatal screening in Europe revisited: an ISNS perspective on the current state and developments since 2010. *International journal of neonatal screening*. 2021;7(1), 15.
11. Lucas T.G., Henriques B.J., Gomes C.M. Conformational analysis of the riboflavin-responsive ETF: QO-p. Pro456Leu variant associated with mild multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2020;1868(6): 140393.
12. Воронин С.В., Захарова Е.Ю., Байдакова Г.В. и др. Расширенный неонатальный скрининг на наследственные заболевания

- в России: первые итоги и перспективы. Педиатрия им. Г.Н. Сперанского. 2024;103(1): 16-29.
13. Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б. и др. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2). Медицинская генетика. 2019;18(2): 3-23.
 14. Browning M.F., Larson C., Strauss A., et al. Normal acylcarnitine levels during confirmation of abnormal newborn screening in long-chain fatty acid oxidation defects. *Journal of inherited metabolic disease*. 2005;28(4): 545-550.
 15. Angle B., Burton B.K. Risk of sudden death and acute life-threatening events in patients with glutaric acidemia type II. *Molecular genetics and metabolism*. 2008;93(1): 36-39.
 16. Goodman S.I., Binard R.J., Woontner M.R., et al. Glutaric acidemia type II: gene structure and mutations of the electron transfer flavoprotein: ubiquinone oxidoreductase (ETF: QO) gene. *Molecular genetics and metabolism*. 2002; 77(1-2): 86-90.
 17. Prasun P., Evans A., Cork E., et al. A novel deleterious ETFA promoter variant causative of multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2023;191(4): 1089-1093.
 18. Seydtaghia M.R., Jafarzadeh-Esfehani R., Hosseini S., et al. A compound heterozygote case of glutaric aciduria type II in a patient carrying a novel candidate variant in ETFDH gene: A case report and literature review on compound heterozygote cases. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*. 2024;12(7): e2489.
 19. Zhuo Z., Jin P., Li F., et al. A case of late-onset riboflavin responsive multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MADD) with a novel mutation in ETFDH gene. *Journal of the Neurological Sciences*. 2015;353(1-2): 84-86.
 20. Watmough N.J., Frerman F.E. The electron transfer flavoprotein: Ubiquinone oxidoreductases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 2010;1797(12): 1910-1916. [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle. 1993-2024.
 7. Wen B., Tang R., Tang S., et al. A comparative study on riboflavin responsive multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency due to variants in FLAD1 and ETFDH gene. *Journal of Human Genetics*. 2024;69(3): 125-131.
 8. Wen B., Tang S., Lv X., et al. Clinical, pathological and genetic features and follow-up of 110 patients with late-onset MADD: a single-center retrospective study. *Human molecular genetics*. 2022;31(7): 1115-1129.
 9. Lin Y., Zhang W., Chen Z., et al. Newborn screening and molecular features of patients with multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency in Quanzhou, China. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*. 2021;34(5): 649-652.
 10. Loeber J.G., Platis D., Zetterström R.H., et al. Neonatal screening in Europe revisited: an ISNS perspective on the current state and developments since 2010. *International journal of neonatal screening*. 2021;7(1), 15.
 11. Lucas T.G., Henriques B.J., Gomes C.M. Conformational analysis of the riboflavin-responsive ETF: QO-p. Pro456Leu variant associated with mild multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2020;1868(6): 140393.
 12. Voronin S.V., Zakharova E.Yu., Baydakova G.V., et al. Rasshiernyye neonatal'nyy skринing na nasledstvennyye zabolovaniya v Rossii: pervyye itogi i perspektivy [Advanced neonatal screening for hereditary diseases in Russia: first results and future prospects]. *Pediatriya im. G.N. Speranskogo [Pediatrics n.a. G.N. Speransky]*. 2024; 103 (1): 16-29. (In Russ.)
 13. Ryzhkova O.P., Kardymon O.L., Prohorchuk E.B., et al. Rukovodstvo po interpretatsii dannykh posledovatel'nosti DNK cheloveka, poluchennykh metodami massovogo parallel'nogo sekvenirovaniya (MPS) (redaktsiya 2018, versiya 2) [Guidelines for the interpretation of massive parallel sequencing variants (update 2018, v2)]. *Meditsinskaya genetika [Medical Genetics]*. 2019;18(2):3-23. (In Russ.)
 14. Browning M.F., Larson C., Strauss A., et al. Normal acylcarnitine levels during confirmation of abnormal newborn screening in long-chain fatty acid oxidation defects. *Journal of inherited metabolic disease*. 2005;28(4): 545-550.
 15. Angle B., Burton B.K. Risk of sudden death and acute life-threatening events in patients with glutaric acidemia type II. *Molecular genetics and metabolism*. 2008;93(1): 36-39.
 16. Goodman S.I., Binard R.J., Woontner M.R., et al. Glutaric acidemia type II: gene structure and mutations of the electron transfer flavoprotein: ubiquinone oxidoreductase (ETF: QO) gene. *Molecular genetics and metabolism*. 2002; 77(1-2): 86-90.
 17. Prasun P., Evans A., Cork E., et al. A novel deleterious ETFA promoter variant causative of multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2023;191(4): 1089-1093.
 18. Seydtaghia M.R., Jafarzadeh-Esfehani R., Hosseini S., et al. A compound heterozygote case of glutaric aciduria type II in a patient carrying a novel candidate variant in ETFDH gene: A case report and literature review on compound heterozygote cases. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*. 2024;12(7): e2489.
 19. Zhuo Z., Jin P., Li F., et al. A case of late-onset riboflavin responsive multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MADD) with a novel mutation in ETFDH gene. *Journal of the Neurological Sciences*. 2015;353(1-2): 84-86.
 20. Watmough N.J., Frerman F.E. The electron transfer flavoprotein: Ubiquinone oxidoreductases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 2010;1797(12): 1910-1916.

References

1. Lindner M., Hoffmann G.F., Matern D. Newborn screening for disorders of fatty-acid oxidation: experience and recommendations from an expert meeting. *Journal of Inherited Metabolic Disease: Official Journal of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism*. 2010;33(5): 521-526.
2. Serebrennikov V.N., Baksheev V.I., Serebrennikova K.V., et al. Ul'traredekaya forma narusheniya metabolizma zhirnykh kislot u vzroslykh: klinicheskoye nablyudeniye [An ultra-rare form of fatty acid metabolism disorder in adults: a case report]. *Meditsinskaya genetika [Medical Genetics]*. 2023;22(11):58-64. (In Russ.)
3. Cornelius N., Frerman F.E., Corydon T.J., et al. Molecular mechanisms of riboflavin responsiveness in patients with ETF-QO variations and multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency. *Human molecular genetics*. 2012;21(15): 3435-3448.
4. Fan X., Xie B., Zou J., et al. Novel ETFDH mutations in four cases of riboflavin responsive multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Molecular genetics and metabolism reports*. 2018;16: 15-19.
5. Grünert S.C. Clinical and genetical heterogeneity of late-onset multiple acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *Orphanet journal of rare diseases*. 2014;9: 1-8.
6. Prasun P. Multiple Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency. 2020. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, et al. (editors). *GeneReviews*®