

Дефицит лизосомной кислой липазы у российских больных: молекулярная характеристика и эпидемиология

Каменец Е.А.¹, Печатникова Н.Л.², Какаулина В.С.³, Михайлова С.В.³,
Строкова Т.В.^{4,5}, Жаркова М.С.⁶, Потехин О.Е.², Захарова Е.Ю.¹

- 1 — ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»
15522, г. Москва, ул. Москворечье д., 1
- 2 — ГБУЗ «Морозовская детская городская клиническая больница Департамента здравоохранения Москвы»
119049, г. Москва, 4-й Добрынинский переулок, д. 1/9
- 3 — Российская детская клиническая больница ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России
119571, Москва, Ленинский пр-т, д. 117
- 4 — ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр питания и биотехнологии»
109240, г. Москва, Устьинский проезд, д. 2/14
- 5 — ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
117997 г. Москва, ул. Островитянова, д. 1
- 6 — ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской Федерации
119991 г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

Введение. Дефицит лизосомной кислой липазы (ДЛКЛ) – континуум аутосомно-рецессивно наследуемых фенотипов, обусловленных генетическими дефектами фермента лизосомной кислой липазы (ЛКЛ), играющего ключевую роль в обмене липидов. ЛКЛ кодируется геном *LIPA*, наиболее распространенный патогенный вариант которого – с.894G>A – является причиной заболевания в более чем половине случаев. Точная частота ДЛКЛ неизвестна, в России она предположительно составляет от 1:150 000 до 1:100 000 новорожденных.

Цель: биохимический скрининг на ДЛКЛ в группе высокого риска, изучение спектра мутаций гена *LIPA* и оценка встречаемости заболевания в г. Москве.

Методы. В исследовании участвовали 1999 пациентов из различных регионов РФ с подозрением на лизосомные болезни накопления (ЛБН). Выборку для исследования носительства частого варианта гена *LIPA* составили сухие пятна крови 920 живых новорожденных г. Москвы. Активность ЛКЛ измерялась флуориметрическим методом в сухих пятнах крови. Кодировочная последовательность гена *LIPA* изучалась путём прямого секвенирования и ПДРФ-анализа.

Результаты. Тридцати четырем пациентам установлен диагноз ДЛКЛ. Выявлено 16 вариантов гена *LIPA*, из них 11 не описаны ранее. Десять вариантов – высоковероятно патогенные, один – неясного значения. Наиболее частой мутацией в выборке был аллель с.894G>A, что характерно для большинства европейских популяций. Частота данного аллеля у 920 новорожденных Москвы составила 1:270. Исходя из этого, расчетная частота встречаемости ДЛКЛ составила 1:73 159, что превышает ориентировочную оценку для РФ.

Заключение. Целесообразен скрининг на ДЛКЛ пациентов с подозрением на ЛБН. Аллельная частот варианта с.894G>A среди выявленных вариантов гена *LIPA* сопоставима с таковой в европейских исследованиях. В отличие от этих работ у российских больных встретилось относительно много различных вариантов гена, ранее описываемых крайне редко или неописанных. Расчетная частота заболеваемости ДЛКЛ в г. Москве превышает предполагаемую для РФ.

Ключевые слова: кислая липаза; дефицит лизосомной кислой липазы; болезнь Вольмана; *LIPA*; лизосомные болезни накопления; ПДРФ-анализ.

Для цитирования: Каменец Е.А., Печатникова Н.Л., Какаулина В.С., Михайлова С.В., Строкова Т.В., Жаркова М.С., Потехин О.Е., Захарова Е.Ю. Дефицит лизосомной кислой липазы у российских больных: молекулярная характеристика и эпидемиология. *Медицинская генетика* 2019; 18(8): 3-16.

DOI: 10.25557/2073-7998.2019.08.3-16

Автор для корреспонденции: Каменец Елена Анатольевна; e-mail: elenakamenec@yandex.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования России на выполнение НИР в 2019 году.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Поступила: 24.08.2019.

Lysosome acid lipase deficiency in russian patients: molecular characteristic and epydemiology

**Kamenets E.A.¹, Pechatnikova N.L.², Kakaulina V.S.², Mikhaylova S.V.³,
Strokova T.V.^{4,5}, Zharkova M.S.⁶, Potehin O.E.², Zakharova E.Y.¹**

1 — Research Centre for Medical Genetics
Moskvorechie st. 1, 115522 Moscow, Russia

2 — «Morozov municipal children's Hospital of Moscow City» of Moscow Health Department,
4th Dobryninsky pereulok 1/9, 119049 Moscow, Russia

3 — Russian Children's Clinical Hospital of the Pirogov Russian National Research Medical University
Leninsky prospect 117, 119571 Moscow, Russia

4 — Federal Research Center for Nutrition and Biotechnology
Ust'inskiy proezd 2/14, 109240 Moscow, Russia

5 — Pirogov Russian National Research Medical University
Ostrovityanova st. 1, 117997 Moscow, Russia

6 — I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation
Trubetskaya st. 8, 119991, Moscow, Russia

Background. Lysosomal acid lipase deficiency (LALD) is a continuum of autosomal recessive diseases caused by defects in the enzyme of lipid metabolism, lysosomal acid lipase (LAL). LAL encodes by the gene *LIPA*. The most common variant of *LIPA* c.894G>A caused the disease in more than a half of cases. The true frequency of LALD is unknown. In Russia it is supposed to be 1:150000 – 1:100000 of newborns.

The aim of the work is the selective biochemical screening for LALD, the study of *LIPA* mutation spectrum and the estimation of the LALD incidence in Moscow.

Materials and methods. 1999 patients suspected of lysosomal storage diseases (LSD) took part in the study. Dried blood spots of 920 newborns of Moscow were obtained for the estimation of c.894G>A allelic frequency. LAL activity was measured by fluorometric analysis. The *LIPA* gene was studied by direct sequencing and RFLP-analysis.

Results and discussion. In 34 cases diagnosis of LALD was confirmed. Totally, 16 different variants of *LIPA* were found, 11 variants were novel. Ten of the novel variants were classified as pathogenic, one was uncertain significance. The allele c.894G>A was the most common *LIPA* variant in the cohort of patients, so as in many Europe populations. The allelic frequency of the variant in the newborns collection was estimated as 1:270 and LALD frequency was 1:73.159.

Conclusion. Screening for LALD is a useful tool for diagnostics among LSD suspected patients. The allelic frequency of the variant c.894G>A seems the same as in European populations. In comparison with this data, there are many rare and novel variants in the Russian cohort.

Keywords: acid lipase; lysosomal acid lipase deficiency; Wolman disease; *LIPA*; lysosomal storage diseases; RFLP-analysis

For citation: Kamenets E.A., Pechatnikova N.L., Kakaulina V.S., Mikhaylova S.V., Strokova T.V., Zharkova M.S., Potehin O.E., Zakharova E.Y. Lysosome acid lipase deficiency in Russian patients: molecular characteristic and epydemiology. *Medical genetics* 2019; 18(8): 3-16. (In Russ.).

DOI: 10.25557/2073-7998.2019.08.3-16

Corresponding author. Kamenets Elena; **e-mail:** elenakamenec@yandex.ru

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

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

Accepted: 24.08.2019.

Введение

Дефицит лизосомной кислой липазы (ДЛКЛ) (MIM#278000) — редкое аутосомно-рецессивное заболевание из группы лизосомных болезней накопления (ЛБН), обусловленное генетическими дефектами фермента лизосомной кислой липазы (ЛКЛ), который играет ключевую роль в обмене липидов. ЛКЛ расщепляет нейтральные липиды на свободный холестерин и жирные кислоты. Нарушение функции фермента приводит к накоплению эфиров холе-

стерина (ЭХ) и триглицеридов (ТГ) в клетках различных тканей, в особенности печени и селезенки, и в клетках макрофагально-моноцитарной системы [1, 2].

Клинически выделяют инфантильную форму или болезнь Вольмана (БВ) — манифестирующее в первые недели или месяцы жизни быстро прогрессирующее заболевание с крайне неблагоприятным прогнозом, и болезнь накопления эфиров холестерина (БНЭХ) с относительно поздним началом, доброкачественным

течением и крайне разнообразными клиническими проявлениями [2]. Однако ДЛКЛ следует рассматривать как континуум клинических фенотипов от крайне тяжелой инфантильной формы до практически бессимптомных [3].

Сравнительно недавно завершены клинические испытания препарата для ферментной заместительной терапии (ФЗТ) ДЛКЛ (себелипаза альфа), представляющего собой рекомбинантную ЛКЛ человека. Было показано, что введение рекомбинантного фермента приводит к значительному снижению у больных уровней печеночных трансаминаз, холестерина в составе ЛПНП, ТГ и содержания жиров в печени [4].

ЛКЛ кодируется геном *LIPA*, картированным на 10-й хромосоме (10q23.31). В гене описано 96 вариантов, ассоциирующих с ДЛКЛ [5] и выявлены гено-фенотипические корреляции: в зависимости от мутации фермент пациентов либо полностью утрачивает активность, что ведет к развитию тяжелого фенотипа, либо сохраняет остаточную каталитическую активность в пределах 1–12% от средней нормы, и формируется клинический фенотип БНЭХ. Наиболее распространенный патогенный аллель — синонимичная замена, повреждающая сайт сплайсинга в экзоне 8, с.894G>A, является причиной заболевания в более чем половине опубликованных случаев [2, 6, 7]. Наличие этого варианта в гомозиготном или компаунд-гетерозиготном состоянии обеспечивает функциональную активность ЛКЛ на уровне 3–5% и доброкачественное течение заболевания [2, 6, 8].

Более 50% других известных мутаций ДЛКЛ представляют собой миссенс-мутации. Для некоторых характерна этническая специфичность. Так частота аллеля с.966+2G>T (IVS9 +2G>T), ассоциированного с полной потерей активности ЛКЛ, достигает 40% у испанских пациентов [8], аллель с.250G>T (p.G87V) имеет чрезвычайно высокую частоту в популяции иранских евреев [9].

Точная частота ДЛКЛ неизвестна, в Европе она составляет от 1:300 000 до 1:40 000 живых новорожденных [2, 8, 10, 11]. Предполагаемая частота встречаемости в России — 1:100 000–150 000 [12].

Для подтверждения диагноза ДЛКЛ проводят определение активности ЛКЛ в сухих пятнах крови (dried blood spots, DBS) в присутствии высокоспецифичного ингибитора (Lalistat-2) [13].

Цель

Целью данной работы являлся биохимический скрининг на ДЛКЛ в группе высокого риска, изучение спектра мутаций гена *LIPA* и оценка частоты заболевания среди российских пациентов.

Материалы и методы

Материалы

За период 2016–2018 гг. в лабораторию были направлены сухие пятна крови 1998 пациентов с подозрением на ДЛКЛ и другие ЛБН. Пациенты направлялись из различных регионов РФ, главным образом из Центрального федерального округа; соотношение полов было почти равным, возраст варьировал от первых недель жизни до 45 лет. Также в исследование были включены ретроспективные данные 1 пациентки, которой проводили диагностику на ДЛКЛ в 2001 году. От каждого пациента или его законного представителя получено письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Выборку для исследования носительства частого варианта гена *LIPA* составили сухие пятна крови 920 живых новорожденных г. Москвы, любезно предоставленные сотрудниками Морозовской ДГКБ.

Методы

Биохимические методы

Активности ЛКЛ измеряли флуориметрическим методом, как описано ранее J. Hamilton с соавт. [13].

Молекулярно-генетический анализ

ДНК выделялась из цельной венозной крови с ЭДТА или сухих пятен крови с использованием набора DNAPrep100 Kit (IsoGene, Москва) по протоколам производителя. Кодировочные экзоны гена *LIPA* (экзоны 2–10) амплифицировали с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР). Анализ проводили путём прямого секвенирования на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500xL (Applied Biosystems, США), а также определения длин рестрикционных фрагментов после обработки эндонуклеазой Bst2UI (ООО «СибЭнзим-М», Москва) с последующей визуализацией в полиакриламидном геле. Последовательности праймеров и протоколы ПЦР доступны по запросу. Анализ результатов секвенирования по Сэнгеру проводили с использованием программного обеспечения Chromas и Nucleotide-BLAST. Варианты гена *LIPA* аннотированы в соответствии с руководством Human Genome Variation Society (<http://www.hgvs.org/mutnomen>) с использованием референсных последовательностей NCBI NM_000235.3, NG_008194.1.

Клинические данные пациентов

Ретроспективный обзор клинических данных пациентов, манифестных признаков и симптомов заболевания, а также биохимические показатели (АЛТ и АСТ,

общий холестерин, ЛПНП, ЛПВП, ТГ), предоставлены врачами пациентов. Некоторые клинические и лабораторные данные были опубликованы ранее [12, 14, 15].

Оценка патогенности выявленных вариантов гена *LIPA*

Интерпретация и классификация впервые выявленных вариантов гена *LIPA* проводилась с помощью «Руководства по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2)» [16].

Анализ *in silico* проводился с использованием алгоритмов прогнозирования/программного обеспечения PolyPhen2, SIFT, PROVEAN (для миссенс-вариантов), Human Splicing Finder и NetGene2 (для вариантов альтернативного сплайсинга). Для новой синонимичной мутации с.600G>A определение патогенности основывалось на анализе кДНК путем прямого секвенирования и функционального анализа методом минигена.

Результаты

В ходе биохимического скрининга 1998 пациентов с подозрением на ЛБН у 33 больных из 29 неродственных семей выявлена низкая активность ЛКЛ. За положительный результат биохимического теста на ДЛКЛ приняты значения активности фермента, не превышающие 0,04 нмоль/пятно/ч. Всем 33 пациентам, проведен молекулярно-генетический анализ и выявлены мутации в гене *LIPA*. Также патогенные варианты *LIPA* были выявлены у пациентки, обследованной в 2001 г. по поводу подозрения на ДЛКЛ.

Генетический анализ

Из 34 генотипированных пациентов у 11 обнаружена частая мутация с.894G>A в гомозиготном состоянии и у 18 — в компаунд-гетерозиготном состоянии. У 6 пациентов выявлен второй по частоте патогенный аллель с.796G>T (p.G266*). Также найдено 3 других ранее описанных патогенных варианта: с.309C>A, с.398delC, с.894+1G>A и 11 новых вариантов гена *LIPA*.

Из неописанных ранее вариантов три — с.348G>A (p.W116*), с.398C>A (p.S133*) и с.420G>A (p.W140*) — приводят к образованию стоп-кодона и рассматриваются как однозначно патогенные («очень сильный» критерий патогенности согласно рекомендациям для интерпретации данных, полученных методом NGS [16]). То же можно сказать о 5 аллелях, приводящих к сдвигу рамки считывания 167_170dup4 (p.L61Yfs*5), с.421delG (p.A141Lfs*20), с.442delG (p.A148Qfs*13), с.817_818delAA (p.N273Yfs*3) и с.911_912delinsT

(p.K304Ifs*4). Более того, в кодонах 116, 133 и 140 описаны другие замены, приводящие к тем же изменениям в первичной структуре белка («модерирующий» критерий патогенности). Однонуклеотидная замена с.-3A>G (p.?) располагается в каноничном сайте сплайсинга перед экзоном 2, содержащим иницирующий кодон. Биоинформатический анализ варианта с использованием алгоритмов Human Splicing Finder and NetGene-2 показал, что замена с высокой вероятностью приводит к делеции первого кодирующего экзона в транскрипте гена *LIPA*. Биоинформатический анализ синонимичной замены с.600G>A в экзоне 6 показал высокую вероятность активации криптогенного сайта сплайсинга в экзоне, что приводит к делеции 63 п.н. в транскрипте и соответствует делеции с.541_603del63 в кДНК. Родители пациента, состоящие в близкородственном браке, являются носителями данного варианта. Исследование кДНК подтвердило наличие делеции в гомозиготном состоянии у пробанда и в гетерозиготном — у обоих родителей («сильный» критерий патогенности).

Семейный анализ вариантов с.398C>A и с.420G>A, показал, что эти аллели находятся в транс-положении относительно частого аллеля с.894G>A («модерирующий» критерий патогенности). Одиннадцатый неописанный вариант представляет собой миссенс-замену с.956A>T (p.H319L), для оценки ее патогенности был проведен биоинформатический анализ с использованием программ PolyPhen-2, SIFT и PROVEAN («вспомогательный» критерий патогенности).

Популяционные частоты выявленных вариантов по данным базы данных gnomAD не превышают ожидаемых для патогенных вариантов с аутосомно-рецессивным типом наследования (0,5%) [16], или эти варианты не встречаются в контрольной выборке («модерирующий» критерий патогенности).

Заключение о функциональной значимости выявленных вариантов вынесено согласно правилам комбинирования критериев [16]. Все данные по оценке патогенности суммированы в табл. 1.

Краткая клиническая характеристика

Пациенты с БВ

Трем пациентам был установлен диагноз БВ. Двое больных — компаундные гетерозиготы по одному описанному аллелю и неописанному варианту с.348G>A: генотипы с.[348G>A];[398delC] и с.[348G>A];[796G>T]; третий пациент гетерозиготен по двум новым вариантам: с.[442delG];[817_818delAA].

Все пять вариантов являются LOF-мутациями («loss of function») [16], приводящими к полной утрате функциональной активности фермента.

У всех 3 детей заболевание манифестировало в первые месяцы жизни. Первыми симптомами у всех являлись выраженная гепатоспленомегалия и анемия, у одного пациента наблюдалась гипотрофия. В препаратах костного мозга у двух пациентов обнаружено сужение роста тромбоцитов, задержка созревания лейкоцитов, скопления макрофагов с «пенистой» цитоплазмой. При ультразвуковом исследовании (УЗИ) и компьютерной

томографии (КТ) органов брюшной полости у всех пациентов выявляли выраженную гепатоспленомегалию, а также кальцинаты в надпочечниках. В биохимическом анализе крови наблюдалось повышение уровней печеночных трансаминаз, билирубина и холестерина за счет фракции ЛПНП. Основные биохимические показатели пациентов представлены в **табл. 2**. Состояние пациентов стремительно ухудшалось вследствие полиорган-

Таблица 1

Интерпретация и классификация выявленных вариантов в гене *LIPA* по их функциональной значимости

№	Вариант	Эффект	Аллельная частота (gnomAD)	HGMD ID	Литературные источники	Poly-Phen-2	SIFT	PROVEAN	Значение варианта
Описанные варианты									
1	c.309C>A (p.S103R)	Миссенс	0,000008	CM1617783	[15;17]	Вероятно патогенный	Повреждающий	Повреждающий	Вероятно патогенный
2	c.398delC (p.S133*)	Нонсенс	0,00002	HD971471	[4]				Вероятно патогенный
3	c.796G>T (p.G266*)	Нонсенс	НД	CM960945	[18;19]				Патогенный
4	c.894G>A (p.275_298del)	Повреждение сайта сплайсинга	0,000827	CS951467	[4;20;21]	Повреждение донорного сайта сплайсинга, согласно Human Splicing Finder и NetGene-2			Патогенный
5	c.894+1G>A (p.275_298del)	Повреждение сайта сплайсинга	НД	CS963024	[18;19]	Повреждение донорного сайта сплайсинга, согласно Human Splicing Finder и NetGene-2			Патогенный
Неописанные варианты									
1	c.-3A>G (p.?)	Повреждение сайта сплайсинга	НД	-	-	Повреждение акцепторного сайта сплайсинга, согласно Human Splicing Finder и NetGene-2			Вероятно патогенный
2	c.177_180dup4 (p.L61Yfs5*)	Сдвиг рамки считывания	НД	-	-	-	-	-	Вероятно патогенный
3	c.348G>A (p.W116*)	Нонсенс	НД	-	-	-	-	-	Патогенный
4	c.398C>A (p.S133*)	Нонсенс	НД	-	-	-	-	-	Вероятно патогенный
5	c.420G>A (p.W140*)	Нонсенс	НД	-	-	-	-	-	Патогенный
6	c.421delG (p.A141Lfs*20)	Сдвиг рамки считывания	НД	-	-	-	-	-	Вероятно патогенный
7	c.442delG (p.A148Qfs*13)	Сдвиг рамки считывания	НД	-	-	-	-	-	Вероятно патогенный
8	c.600G>A (p.180_200del)	Возникновение альтернативного сайта сплайсинга	НД	-	-	Возникновение нового акцепторного сайта сплайсинга согласно Human Splicing Finder и NetGene-2			Патогенный
9	c.817_818delAA (p.N273Yfs3*)	Сдвиг рамки считывания	НД	-	-	-	-	-	Вероятно патогенный
10	c.911_912delinsT (p.K304Ifs4*)	Сдвиг рамки считывания	НД	-	-	-	-	-	Вероятно патогенный
11	c.956A>T (p.H319L)	Миссенс	НД	-	-	Возможно патогенный	Повреждающий	Повреждающий	Неопределенного значения

ной недостаточности. Смерть наступила спустя 1–3 месяца после появления первых симптомов.

Проводилась дифференциальная диагностика с другими ЛБН. Активность лизосомных ферментов сфингомиелиназы, гексоаминидазы, глюкоцереброзидазы была в пределах референсных значений. Одному из пациентов проводился анализ активности ЛКЛ в лейкоцитах. Было выявлено снижение активности (0,8 ммоль/мг/ч при норме >23,4 ммоль/мг/ч). Двум другим пациентам проводился анализ в DBS — выявлено резкое снижение активности ЛКЛ.

Пациенты с БНЭХ

Тридцати одному пациенту на основании клинико-лабораторных данных был установлен диагноз БНЭХ. Возраст возникновения первых симптомов варьировал от 4 месяцев до 18 лет (медиана составила 3 г). Генотипы и основные биохимические показатели пациентов с БНЭХ представлены в табл. 3.

Наиболее распространенным симптомом у больных являлась умеренная гепатомегалия, наблюдавшаяся при первом обращении у 23 пациентов (72%), у 8 из них также при первом обследовании выявлялось увеличение селезенки (25%). Уровни АЛТ и АСТ в крови варьировали в диапазоне от нормальных (менее 37 ед/л и 47 ед/л соответственно) до 20-кратно превышающих референсные значения, чаще всего показатели колебались в пределах от 2- до 4-кратного увеличения.

Дислипидемия с повышением уровней общего холестерина и холестерина ЛПНП в той или иной степени присутствовала у всех пациентов, за исключением одного с умеренно повышенным холестерином и ЛПНП в пределах референсных значений. При этом уровень ТГ (там, где представлен), был нормальным, либо умеренно повышенным (8 и 11 случаев соответственно), уровень ЛПВП — пониженным в 10 случаях, и в 17 случаях нормальным (у 4 пациентов данные не представлены).

При проведении инструментальных исследований (УЗИ, КТ, магнитно-резонансной томографии брюшной полости) у всех пациентов были выявлены гепатомегалия и диффузные изменения в паренхиме печени. Доступные данные исследования биоптатов печени и/или эластографии 19 пациентов демонстрировали различные стадии фиброза от начальной до цирроза и печеночной недостаточности. При микроскопическом исследовании препаратов печени выявлены микровезикулярный стеатоз и «пенистые» клетки Купфера и макрофаги.

У одного из пациентов с фенотипом БНЭХ выявлена не описанная ранее однонуклеотидная синонимичная замена с.600G>A в гомозиготном состоянии. Биоинформатический анализ с использованием программы PyMol показывает, что делеция 21 аминокислотного остатка, возникающая вследствие неправильного сплайсинга и делеции в транскрипте, затрагива-

Таблица 2

Биохимические показатели и генотипы пациентов с диагнозом БВ

№	Пол	Лабораторные данные при первой консультации	Активность ЛКЛ	Возраст постановки диагноза	Генотип
1	Ж	АЛТ 130 АСТ 424 ОХ 6,80 ЛПВП-Х 0,80 ЛПНП-Х 5,95 ТГ н.д.	0,8 ммоль/мг/ч	4 мес	с.348G>A/ с.398delC
2	М	АЛТ 33 АСТ 295 ОХ 6,00 ЛПВП-Х н.д. ЛПНП-Х н.д. ТГ н.д.	0,04 нмоль/пятно/ч	3 мес	с.348G>A/с.796G>T
3	Ж	АЛТ 99 АСТ 413 ОХ 6,55 ЛПВП-Х 1,49 ЛПНП-Х 5,90 ТГ 3,12	0,00 нмоль/пятно/ч	3 мес	с.442delG/ с.817_818delAA

Таблица 3

Биохимические показатели и генотипы пациентов с диагнозом БНЭХ

№	Пол	Лабораторные данные при первой консультации*	Активность ЛКЛ, нмоль/пятно/ч	Возраст постановки диагноза	Генотип
Пациенты, гомозиготные по варианту с.894G>A					
1	М	АЛТ 180,0 АСТ 95,0 ОХ 8,35 ЛПВП н.д. ЛПНП н.д. ТГ 0,94	0,00	14 лет	с.894G>A/с.894G>A
2	Ж	АЛТ 163,0 АСТ 131,0 ОХ 9,33 ЛПВП 1,20 ЛПНП 7,53 ТГ 8,69	0,00	8 лет	с.894G>A/с.894G>A
3	Ж	АЛТ 124,0 АСТ 81,0 ОХ 9,55 ЛПВП 0,92 ЛПНП 8,40 ТГ 1,34	0,01	7 лет	с.894G>A/с.894G>A
4	Ж	АЛТ 183,2 АСТ 144,0 ОХ 6,16 ЛПВП 1,28 ЛПНП 4,60 ТГ 0,94	0,00	9 лет	с.894G>A/с.894G>A
5	Ж	АЛТ 114,0 АСТ 148,0 ОХ 8,20 ЛПВП 1,10 ЛПНП 6,19 ТГ 1,97	0,00	13 лет	с.894G>A/с.894G>A
6	М	АЛТ 188,0 АСТ 80,0 ОХ 7,01 ЛПВП 0,80 ЛПНП 5,02 ТГ 2,56	0,00	32 года	с.894G>A/с.894G>A
7	Ж	АЛТ 134,0 АСТ 86,0 ОХ 8,00 ЛПВП 1,00 ЛПНП 7,07 ТГ н.д.	0,00	7 лет	с.894G>A/с.894G>A
8	М	АЛТ 88 АСТ 125 ОХ 5,90 ЛПВП 1,05 ЛПНП 4,58 ТГ 0,94	0,03	6 лет	с.894G>A/с.894G>A

Продолжение табл. 3 см. на стр. 10

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

№	Пол	Лабораторные данные при первой консультации*	Активность ЛКЛ, нмоль/пятно/ч	Возраст постановки диагноза	Генотип
9	Ж	АЛТ 210,0 АСТ 146,0 ОХ 11,10 ЛПВП 1,14 ЛПНП 9,08 ТГ 1,51	0,02	9 лет	с.894G>A/с.894G>A
10	Ж	АЛТ 160,0 АСТ 118,0 ОХ 9,07 ЛПВП 1,45 ЛПНП 8,24 ТГ н.д.	0,01	5 лет	с.894G>A/с.894G>A
11	Ж	АЛТ 32,0 АСТ 58,0 ОХ 6,41 ЛПВП 0,60 ЛПНП 3,79 ТГ 1,68	0,03	2 года	с.894G>A/с.894G>A
Пациенты, гетерозиготные по варианту с.894G>A					
1	Ж	АЛТ 198,0 АСТ 78,7 ОХ 7,89 ЛПВП 0,70 ЛПНП 6,00 ТГ н.д.	0,00	8 лет	с.894G>A/с.894+1G>A
2	М	АЛТ 147,5 АСТ 124,1 ОХ 9,70 ЛПВП н.д. ЛПНП 7,90 ТГ н.д.	0,02	7 лет	с.894G>A/с.796G>T
3	Ж	АЛТ 150,0 АСТ 165,4 ОХ 8,05 ЛПВП н.д. ЛПНП 7,30 ТГ н.д.	0,00	4 года	с.894G>A/с.796G>T
4	Ж	АЛТ 122,0 АСТ 99,0 ОХ 8,67 ЛПВП 2,07 ЛПНП 5,57 ТГ 2,26	0,00	18 лет	с.894G>A/с.796G>T
5	М	АЛТ 109,0 АСТ 82,0 ОХ 6,18 ЛПВП 0,90 ЛПНП 5,59 ТГ н.д.	0,02	14 лет	с.894G>A/с.421delG
6	Ж	АЛТ 128 АСТ 62 ОХ 6,18 ЛПВП 1,20 ЛПНП 5,85 ТГ н.д.	0,00	5 лет	с.894G>A/с.796G>T

Продолжение табл. 3 см. на стр. 11

№	Пол	Лабораторные данные при первой консультации*	Активность ЛКЛ, нмоль/пятно/ч	Возраст постановки диагноза	Генотип
7	М	АЛТ 143 АСТ 207 ОХ 7,59 ЛПВП 0,80 ЛПНП 4,63 ТГ 1,76	0,01	10 лет	с.894G>A/ с.420G>A
8	М	АЛТ 258 АСТ 183 ОХ 6,73 ЛПВП 0,59 ЛПНП 5,49 ТГ 2,20	0,00	8 лет	с.894G>A/ с.796G>T
9	Ж	АЛТ 88 АСТ 56 ОХ 9,05 ЛПВП 0,80 ЛПНП 7,77 ТГ 2,36	0,02	9 лет	с.894G>A/ с.420G>A
10	М	АЛТ 132 АСТ 106 ОХ 7,04 ЛПВП 0,90 ЛПНП 5,66 ТГ 1,99	0,01	6 лет	с.894G>A/ с.420G>A
11	Ж	АЛТ 96 АСТ 74 ОХ 9,74 ЛПВП 1,35 ЛПНП 7,94 ТГ 2,17	0,00	12 лет	с.894G>A/ с.817_818delAA
12	М	АЛТ 115 АСТ 111 ОХ 7,20 ЛПВП 0,80 ЛПНП 5,60 ТГ н.д.	0,00	6 лет	с.894G>A/ с.398C>A
13	М	АЛТ 406 АСТ 14 ОХ 6,63 ЛПВП 0,96 ЛПНП 5,30 ТГ н.д.	0,00	5 лет	с.894G>A/с.309C>A
14	М	АЛТ 358 АСТ 47 ОХ 5,84 ЛПВП 1,56 ЛПНП 3,69 ТГ 1,29	0,00	21 год	с.894G>A/с.309C>A
15	Ж	АЛТ 178 АСТ 247 ОХ 7,27 ЛПВП 1,30 ЛПНП 5,86 ТГ 1,21	0,01	5 лет	с.894G>A/ с.911_912delinsT

Продолжение табл. 3 см. на стр. 12

№	Пол	Лабораторные данные при первой консультации*	Активность ЛКЛ, нмоль/пятьно/ч	Возраст постановки диагноза	Генотип
16	М	АЛТ 203 АСТ 142 ОХ 9,50 ЛПВП 1,10 ЛПНП 7,09 ТГ н.д.	0,01	7 лет	с.894G>A/ с.796G>T
17	М	АЛТ 78 АСТ 89 ОХ 6,25 ЛПВП н.д. ЛПНП 5,10 ТГ н.д.	0,02	15 лет	с.894G>A/ с.348G>A
18	Ж	АЛТ 128 АСТ 79 ОХ 7,24 ЛПВП-Х 0,71 ЛПНП-Х 5,85 ТГ 1,20	0,02	6 лет	с.894G>A/ с.-3A>GПримечание
Пациенты без вариантов с.894G>A в генотипе					
1	Ж	АЛТ 308 АСТ 441 ОХ 11,80 ЛПВП 0,80 ЛПНП 8,98 ТГ 2,30	0,01	13 лет	с.600G>A/ с.600G>A
2	Ж	АЛТ 130 АСТ 114 ОХ 10,25 ЛПВП 0,80 ЛПНП 5,95 ТГ н.д.	0,00	19 лет	с.177_180dup4/ с.956A>T

Примечание: * АЛТ – (<37 Ед./л); АСТ – (<47 Ед./л); ОХ – общий холестерин (5,20-3,20 ммоль/л); ЛПВП-Х – холестерин в составе липидов высокой плотности (2,10-0,90 ммоль/л); ЛПНП-Х – холестерин в составе липидов низкой плотности (3,80-1,55 ммоль/л); ТГ – триглицериды (1,70-0,10 ммоль/л).

ет каталитический сайт ЛКЛ, и фермент аномального строения, вероятно, должен быть полностью лишен активности. У пациента заболевание манифестировало довольно рано по сравнению с другими больными БНЭХ. Первые симптомы появились на первом году жизни в виде гепатоспленомегалии и анемии, но, в сравнении с младенческой формой, прогрессировало медленно: цирроз печени, печеночная недостаточность, портальная гипертензия, варикозное расширение вен пищевода развились в возрасте 15 лет, что позволяет предположить, что замена с.600G>A, по аналогии с вариантом с.894G>A, допускает правильный сплайсинг некоторой доли мРНК, что и обеспечивает остаточную активность фермента [2, 7].

Пациент с генотипом с.[177_180dup4(;)956A>T] имел крайне мягкий фенотип. Хотя ДЛКЛ также был выявлен в возрасте 1 года, в возрасте 19 лет наблюда-

лись минимальные изменения и умеренная гепатомегалия. При этом дупликация с.177_180dup4 с очевидностью является LOF-аллелем с полной потерей функциональной активности, что говорит о «мягком» влиянии варианта с.956A>T на функциональную активность ЛКЛ.

Одиннадцать и восемнадцать больных с диагнозом БНЭХ имеют частую мутацию с.894G>A в гомозиготном и компаунд-гетерозиготном состоянии соответственно. Предполагается, что вариант с.894G>A смягчает фенотип ДЛКЛ [17]. LOF-мутации в гомозиготном или компаунд-гетерозиготном состоянии друг с другом, напротив, ведут к развитию БВ.

Анализ спектра мутаций гена *LIPA*

Среди всех 68 выявленных мутантных аллелей наибольшую долю составляет вариант с.894G>A (40 хро-

мосом, аллельная частота в выборке составила 58,8%). Данный результат согласуется с результатами исследований в других европейских популяциях [1, 2, 6, 8]. Принимая во внимание крайне низкие частоты данного аллеля среди представителей других рас [11], можно предположить, что его высокая распространенность в Европе и среди белого населения США является следствием «эффекта основателя». Эту гипотезу подтверждают исследования в испанской и итальянской популяциях по ко-сегрегации варианта с.894G>A с уникальным гаплотипом [6]. Целесообразно предположить такое же объяснение высокой частоты аллеля с.796G>T (6 хромосом, аллельная частота в выборке составила 8,8%) в российской популяции при его крайне редкой встречаемости в других исследованных выборках. Кроме того, мы выявили достаточно высокий процент разнообразных ранее не описанных патогенных изменений в гене *LIPA*, что говорит об особенностях спектра мутаций в РФ.

Среди остальных мутаций превалируют LOF-варианты: нонсенс-замены (включая аллель с.796G>T,

15 хромосом), делеции и дупликации со сдвигом рамки считывания (6 хромосом), изменения в канонических сайтах сплайсинга (2 хромосомы) и синонимичный вариант с.600G>A, встреченный у одной пациентки в гомозиготном состоянии (2 хромосомы), итого 36,8% от общего числа. Остальные находки представлены тремя различными миссенс-заменами (2 описанные и 1 не описанная, всего 4 хромосомы). Соотношение вариантов разного типа в выборке представлено в табл. 4 и на рис. 1 и 2.

Согласно нашим данным, вариант с.894G>A составляет 58,8% от всех мутантных аллелей гена *LIPA* у больных ДЛКЛ. Был разработан метод ПЦР-ПДРФ-анализа для выявления носителей данного варианта в популяции (рис. 3).

С использованием разработанной системы ПДРФ-анализа мы провели определение частоты встречаемости варианта с.894G>A среди новорожденных г. Москвы. В выборке 920 новорожденных (1840 хромосом) выявлено 4 гетерозиготных носителя частого варианта. Таким образом, частота аллеля составляет 4:1840 =

Таблица 4

Аллельные частоты различных патогенных вариантов в гене *LIPA* в выборке больных ДЛКЛ

№	Вариант	Эффект	Количество аллелей в выборке	Аллельная частота в выборке, %
1	c.309C>A (p.S103R)	Миссенс	2	2,9%
2	c.398delC (p.S133*)	Нонсенс	1	1,5%
3	c.796G>T (p.G266*)	Нонсенс	6	8,8%
4	c.894G>A (p.275_298del)	Повреждение сайта сплайсинга	40	58,8%
5	c.894+1G>A (p.275_298del)	Повреждение сайта сплайсинга	1	1,5%
6	c.-3A>G (p.?)	Повреждение сайта сплайсинга	1	1,5%
7	c.177_180dup4 (p.L61Yfs*5)	Сдвиг рамки считывания	1	1,5%
8	c.348G>A (p.W116*)	Нонсенс	3	4,4%
9	c.398C>A (p.S133*)	Нонсенс	2	2,9%
10	c.420G>A (p.W140*)	Нонсенс	3	4,4%
11	c.421delG (p.A141Lfs*20)	Сдвиг рамки считывания	1	1,5%
12	c.442delG (p.A148Qfs*13)	Сдвиг рамки считывания	1	1,5%
13	c.600G>A (p.180_200del)	Возникновение альтернативного сайта сплайсинга	2	2,9%
14	c.817_818delAA (p.N273Yfs*3)	Сдвиг рамки считывания	2	2,9%
15	c.911_912delinsT (p.K304Ifs*4)	Сдвиг рамки считывания	1	1,5%
16	c.956A>T (p.H319L)	Миссенс	1	1,5%

1:460. Поскольку большинство больных ДЛКЛ, участвовавших в исследовании, проживают в Центральной России, долю аллеля с.894G>A, рассчитанную в их выборке, можно считать действительной для Москвы, следовательно, частота всех мутантных аллелей гена *LIPA* (q) в выборке новорожденных должна составить $1:(460 \cdot 0,588) \approx 1:270$ (доверительный интервал от 1:625 до 1:147).

Исходя из соотношения Харди-Вайнберга, расчетная частота встречаемости гомозигот и компаунд-гетерозигот по всем патогенным вариантам в изученной выборке составляет 1:73 159 или 0,000014.

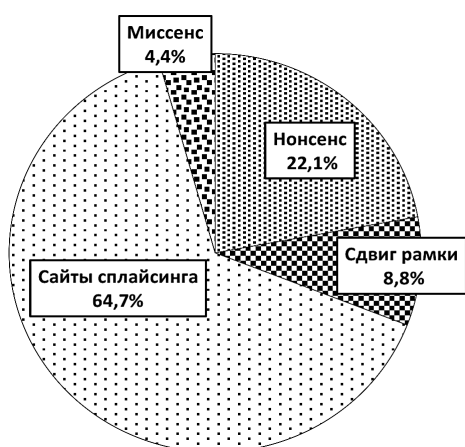


Рис. 1. Распределение вариантов гена *LIPA* в выборке пациентов с ДЛКЛ по эффекту.

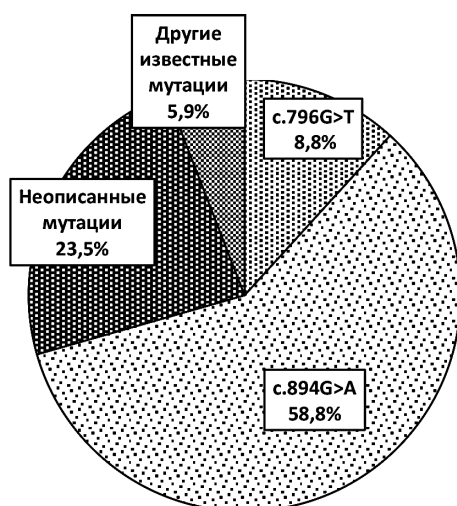


Рис. 2. Распределение выявленных вариантов гена *LIPA* по частоте представленности в обследованной выборке пациентов.

Полученная расчетная частота ДЛКЛ существенно ниже, чем в некоторых странах Европы (например, 1:40000 в Германии [10]), близка к частоте, рассчитанной Федяковым с соавт. для выборки из 523 человек из Северо-Западного и Центрального регионов РФ (1:67 600) [18], и значительно превышает предполагаемую для России (1:150 000 – 1:100 000) [12].

Заключение

В ходе селективного скрининга в группе больных ЛБН на основании измерения активности ЛКЛ диагноз ДЛКЛ был установлен 33 пациентам, т.е. более 1,5%, что для редкого заболевания является высоким показателем. Измерение активности фермента в присутствии ингибитора в DBS на сегодняшний день является наиболее точным и воспроизводимым биохимическим методом анализа на ДЛКЛ. Поэтому мы рекомендуем включать анализ на ДЛКЛ в первую линию диагностических мероприятий при подозрении на ЛБН.

Нами изучен спектр мутаций гена *LIPA* у российских пациентов с ДЛКЛ. Показано, что подавляющее число патогенных аллелей представляет собой точковые мутации в кодирующей последовательности, и их обнаружение, как правило, не требует применения специфических методик и технологий помимо секвенирования. Однако на примере ДЛКЛ с особенной остротой заметна главная проблема и задача современ-

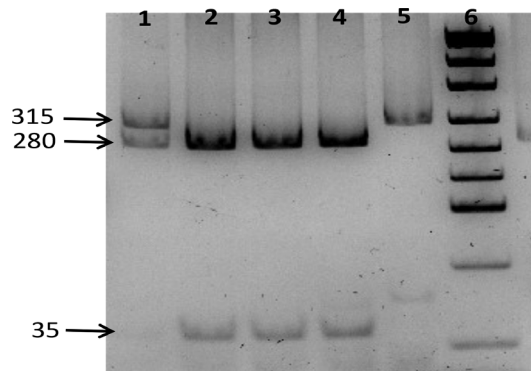


Рис. 3. Детекция варианта с.894G>A. ПДРФ-анализ.

При замене с.894G>A исчезает сайт рестрикции для эндонуклеазы Bst2UI (CC⁺WGG)

1 – фрагмент экзона 8 гена *LIPA* после обработки эндонуклеазой Bst2UI: вариант с.894G>A в гетерозиготном состоянии

2 – 4 – фрагмент экзона 8 гена *LIPA* после обработки эндонуклеазой Bst2UI: норма

5 – фрагмент экзона 8 гена *LIPA* после обработки эндонуклеазой Bst2UI: вариант с.894G>A в гомозиготном состоянии

6 – маркер молекулярного веса.

ной генетической диагностики: определение функциональной значимости новых вариантов. Качественный состав обнаруженных изменений в гене *LIPA* чрезвычайно разнообразен.

Среди патогенных вариантов, выявленных у российских пациентов, наиболее часто встречаются мутация с.894G>A, что характерно для всех европейских популяций, а также сравнительно редкий в других популяциях вариант с.796G>T, что может быть связано с эффектом основателя на территории европейской России. Также найдены ранее не описанные варианты гена *LIPA*, вносящие значимый вклад в генетическую структуру заболевания.

Популяционная частота носительства патогенных вариантов в гене *LIPA* оценена как 1:270. Расчетная частота ДЛКЛ в Москве оценена как 1:73 159, что превышает предполагаемую частоту для РФ 1:100 000 – 1:150 000.

БЛАГОДРНОСТИ:

Авторы выражают сердечную благодарность врачам Морозовской ДГКБ г. Москвы, лечащим врачам пациентов, предоставившим выписки из историй болезни и другую клиническую информацию, и семьям пациентов.

Список литературы

- Reiner Z., Guardamagna O., Nair D. *et al.* Lysosomal acid lipase deficiency - An under-recognized cause of dyslipidaemia and liver dysfunction. *Atherosclerosis*. 2014;235:21-30
- Bernstein D.L., Hulkova H., Bialer M.G. *et al.* Cholesteryl ester storage disease: review of the findings in 135 reported patients with an underdiagnosed disease. *J Hepatol*. 2013;58:1230-43
- <https://ommbid.mhmedical.com/book.aspx?bookid=971&TopLevelContentDisplayName=Books#62632556>
- Burton B.K., Balwani M., Feillet F. *et al.* A Phase 3 Trial of Sebelipase Alfa in Lysosomal Acid Lipase Deficiency. *N Engl J Med*. 2015; 373(11):1010 - 1020
- https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/search_gene.php
- Ruiz-Andrés C., Sellés E., Arias A. *et al.* Lysosomal Acid Lipase Deficiency in 23 Spanish Patients: High Frequency of the Novel c.966+2T>G Mutation in Wolman Disease. *JIMD Rep*. 2017;37:7-12
- Klima H., Ullrich K., Aslandis C. *et al.* A Splice Junction Mutation Causes Deletion of a 72-Base Exon from the mRNA for Lysosomal Acid Lipase in a Patient with Cholesteryl Ester Storage Disease. *J Clin Invest*. 1993;92:2713-2718
- Aguisanda F., Thorne N., Zheng W. Targeting Wolman Disease and Cholesteryl Ester Storage Disease: Disease Pathogenesis and Therapeutic Development. *Current Chemical Genomics and Translational Medicine*, 2017;11:1-18
- Valles-Ayoub Y., Esfandiarifard S., No D. *et al.* Wolman disease (*LIPA* p.G87V) genotype frequency in people of Iranian-Jewish ancestry. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2011;15(6):395-8
- Muntoni S., Wiebusch H., Jansen-Rust M. *et al.* Prevalence of cholesteryl ester storage disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(8):1866-8
- Scott S.A., Liu B., Nazarenko I., Martis S. *et al.* Frequency of the cholesteryl ester storage disease common *LIPA* E8SJM mutation (c.894G>A) in various racial and ethnic groups. *Hepatology* 2013;58:958-65
- Строкова Т.В., Багаева М.Э., Матинян И.А. Дефицит лизосомной кислой липазы. *ПМЖ*. 2016;(15):1
- Hamilton J., Jones I., Srivastava R. *et al.* A new method for the measurement of lysosomal acid lipase in dried blood spots using the inhibitor Lalstatat 2. *Clin Chim Acta*. 2012;413:1207-10
- Строкова Т.В. Нарушение липидного обмена у детей с заболеваниями печени. Эффективная фармакотерапия. 2016;(16):22-26
- Агеева Н.В., Агапова И.А., Амелина Е.Л. и др. Прогрессирующее заболевание печени: дефицит лизосомной кислой липазы (клинические наблюдения). *ПМЖ*. 2018;2(5):96–103
- 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
- Lipiński P., Ługowska A., Zakharova E.Y. *et al.* Diagnostic Algorithm for Cholesteryl Ester Storage Disease: Clinical Presentation in 19 Polish Patients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2018;67(4):452-457.
- Федяков М.А., Барбитов Ю.А., Серебрякова Е.А. и др. Исследование частоты распространения дефицита лизосомной кислой липазы в российской популяции. *Педиатрическая фармакология*. 2018;15(2):184–185

References

- Reiner Z., Guardamagna O., Nair D. *et al.* Lysosomal acid lipase deficiency - An under-recognized cause of dyslipidaemia and liver dysfunction. *Atherosclerosis* 2014; 235:21-30
- Bernstein D.L., Hulkova H., Bialer M.G. *et al.* Cholesteryl ester storage disease: review of the findings in 135 reported patients with an underdiagnosed disease. *J Hepatol*. 2013; 58:1230-43
- <https://ommbid.mhmedical.com/book.aspx?bookid=971&TopLevelContentDisplayName=Books#62632556>
- Burton B.K., Balwani M., Feillet F. *et al.* A Phase 3 Trial of Sebelipase Alfa in Lysosomal Acid Lipase Deficiency. *N Engl J Med*. 2015; 373(11):1010 - 1020
- https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/search_gene.php
- Ruiz-Andrés C., Sellés E., Arias A. *et al.* Lysosomal Acid Lipase Deficiency in 23 Spanish Patients: High Frequency of the Novel c.966+2T>G Mutation in Wolman Disease. *JIMD Rep*. 2017;37:7-12
- Klima H., Ullrich K., Aslandis C. *et al.* A Splice Junction Mutation Causes Deletion of a 72-Base Exon from the mRNA for Lysosomal Acid Lipase in a Patient with Cholesteryl Ester Storage Disease. *J Clin Invest*. 1993;92:2713-2718
- Aguisanda F., Thorne N., Zheng W. Targeting Wolman Disease and Cholesteryl Ester Storage Disease: Disease Pathogenesis and Therapeutic Development. *Current Chemical Genomics and Translational Medicine*, 2017;11:1-18
- Valles-Ayoub Y., Esfandiarifard S., No D. *et al.* Wolman disease (*LIPA* p.G87V) genotype frequency in people of Iranian-Jewish ancestry. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2011;15(6):395-8
- Muntoni S., Wiebusch H., Jansen-Rust M. *et al.* Prevalence of cholesteryl ester storage disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(8):1866-8

11. Scott S.A., Liu B., Nazarenko I., Martis S. *et al.* Frequency of the cholesteryl ester storage disease common *LIPA* E8SJM mutation (c.894G>A) in various racial and ethnic groups. *Hepatology* 2013;58:958-65
12. Strokova T.V., Bagaeva M.E., Matinyan I.A.. Defitsyt lisosmnoy kisloy lipazy [Lysosomal acid lipase deficiency]. *Pediatrics RMJ [Pediatrics RMJ]* 2016. № 15:1-5.
13. Hamilton J., Jones I., Srivastava R. *et al.* A new method for the measurement of lysosomal acid lipase in dried blood spots using the inhibitor Lalstatat 2. *Clin Chim Acta.* 2012;413:1207-10
14. Strokova T.V. Narusheniye lipidnogo obmena u detey s zabolevaniyami pecheni [Abnormalities of lipid metabolism in children with liver diseases]. *Effektivnaya farmakoterapiya [Effective pharmacotherapy]* 2016;(16):22-26
15. Ageeva N.V., Agapova I.A., Amelina E.L. *et al.* Progressiruyushcheye zabolevaniye pecheni: defitsit lizosomnoy kisloy lipazy (klinicheskiye nablyudeniya) [Progressive liver disease: a deficiency of lysosomal acid lipase (clinical cases)]. *Pediatrics RMJ [Pediatrics RMJ]* 2018;2(5):96-103
16. 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)]. *Meditinskaya genetika [Medical genetics]* 2019; 18(2): 3-23
17. Lipiński P., Ługowska A., Zakharova E.Y. *et al.* Diagnostic Algorithm for Cholesteryl Ester Storage Disease: Clinical Presentation in 19 Polish Patients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2018;67(4):452-457.
18. Fedyakov M.A., Barbitov Y.A., Serebryakova E.A. *et al.* Issledovaniye chastoty vstrechayemosti defitsita lizosomnoy kisloy lipazy v rossiyskoy populyatsii [The Incidence of Lysosomal Acid Lipase Deficiency in the Russian Population]. *Pediatricheskaya farmakologiya [Pediatric pharmacology]* 2018; 15 (2): 184-185