

MOLEKULAR-GENETIK DIAGNOSTIKADA ILLUMINA ASOSIDAGI NGS VA BIOINFORMATIK TAHLIL

Ergasheva S.M.², Aripov A.N.¹, Axundjanova L.L.¹, Ibragimova Sh.D.¹, O'rinboyev I.R.¹

¹ Respublika ixtisoslashtirilgan pediatriya ilmiy-amaliy tibbiyot markazi,

² Mirzo Ulug'bek nomidagi O'zbekiston milliy universiteti Toshkent

РЕЗЮМЕ

Цель исследования. Проанализировать интегрированные диагностические подходы, основанные на молекулярно-генетической диагностике в педиатрической практике, технологии Next Generation Sequencing – NGS на платформе Illumina, биоинформатическом анализе, а также определении активности α -галактозидазы A и биомаркера Lyso-GL-3 в образцах сухого пятна крови – DBS, с целью раннего выявления наследственных и редких заболеваний, подтверждения этиологического диагноза и оценки риска повторного возникновения заболевания в семье.

Материал и методы исследования. В исследование были включены 388 пациентов, относящихся к группе высокого риска по болезни Фабри. Молекулярно-генетическое исследование проводилось с использованием технологии Illumina NovaSeq X.

Результаты. Среди 388 пациентов группы высокого риска были выявлены 7 пробандов. По результатам семейного скрининга общее число носителей варианта IVS4+919G> A гена GLA составило 25 человек. У пробандов с подтверждённым диагнозом преобладали поражения сердечно-сосудистой системы, почек и желудочно-кишечного тракта.

Заключение. Сочетание технологии NGS, биохимического скрининга и биоинформатической интерпретации, основанной на критериях ACMG/AMP, способствует созданию эффективного диагностического алгоритма для раннего выявления и подтверждения орфанных заболеваний у детей.

Ключевые слова: Illumina, NGS, биоинформатический анализ, болезнь Фабри, ген GLA, α -галактозидаза A, Lyso-GL-3, педиатрия, орфанные заболевания.

So'nggi yillarda molekulyar-genetik diagnostika klinik tibbiyotning ikkilamchi yo'nalishidan etiologik tashxis qo'yishning asosiy bosqichiga aylandi. Ayniqsa pediatriyada tug'ma rivojlanish nuqsonlari, nevrologik sindromlar, metabolik krizlar, kardiomiopatiyalar, buyrak zararlanishi, ko'rish va eshitish nuqsonlari bilan kechuvchi kasalliklarda aniq tashxislash klinik ahamiyat kasb etadi. Bunday holatlarda bir klinik belgiga asoslangan tashxis asosiy hollarda yetarli bo'lmaydi, chunki ko'plab irsiy kasalliklar fenotipik jihatdan birbiriga o'xshash bo'ladi.

SUMMARY

Objective. To analyze integrated diagnostic approaches in pediatric practice based on molecular genetic diagnostics, Illumina-based Next Generation Sequencing – NGS, bioinformatic analysis, and the determination of α -galactosidase A activity and Lyso-GL-3 biomarkers in dried blood spot – DBS samples, aimed at the early detection of hereditary and rare diseases, confirmation of the etiological diagnosis, and assessment of familial recurrence risk.

Materials and methods. The study included 388 patients belonging to a high-risk group for Fabry disease.

Molecular genetic testing was performed using the Illumina NovaSeq X platform.

Results. Among 388 high-risk patients, 7 probands were identified.

Family screening revealed a total of 25 carriers of the GLA gene IVS4+919G>A variant. In probands with a confirmed diagnosis, cardiovascular, renal, and gastrointestinal involvement predominated.

Conclusion. The combination of NGS technology, biochemical screening, and bioinformatic interpretation based on ACMG/AMP criteria contributes to the development of an effective diagnostic algorithm for the early detection and confirmation of orphan diseases in children.

Keywords: Illumina, NGS, bioinformatic analysis, Fabry disease, GLA gene, α -galactosidase A, Lyso-GL-3, pediatrics, orphan diseases.

Keyingi avlod sekvenslash texnologiyalari, ya'ni Next Generation Sequencing (NGS), bir vaqtning o'zida ko'plab genlarni tahlil qilish, kasallik sababchi nukleotid variantlarini aniqlash hamda natijani klinik fenotip bilan bog'lash imkonini beradi. Illumina platformalari qisqa o'qishli, yuqori o'tkazuvchanlik va past xatolik darajasi bilan klinik laboratoriyalarda keng qo'llanadi [8]. Amaliy diagnostikada bunday tahlil nishon gen paneli, butun ekzom sekvenslash (WES) yoki butun genom sekvenslash (WGS) shaklida bajarilishi mumkin.

Orfan kasalliklar ichida lizosomal saqlash kasalliklari klinik va laborator jihatdan alohida ahamiyatga molik. Fabri kasalligi GLA genidagi patogen variantlar bilan bog‘liq X-xromosomaga bog‘liq lizosomal saqlash kasalligi bo‘lib, α -galaktozidaza A fermenti yetishmovchiligi natijasida globotriaosilseramid va Lyso-GL-3 to‘planishi bilan tavsiflanadi [2,3]. Kasallik yurak, buyrak, periferik nerv tizimi, ko‘z, miya va oshqozon-ichak tizimini zararlashi mumkin. Uning erta belgilari nospetsifik bo‘lgani uchun yuqori xavf guruhlari va oilaviy skrining muhimdir.

Laborator algoritmi faqat sekvenslashdan iborat emas. Klinik diagnostikada DBS namunasi, ferment faolligi, metabolik markerlar, DNK tahlili va variant interpretatsiyasi bir-birini to‘ldiradi. Masalan, Fabri kasalligida α -Gal A faolligining pasayishi, Lyso-GL-3 oshishi va GLA genidagi patogen variantning aniqlanishi birgalikda tashxisni kuchaytiradi [3]. Shu sababli klinik laboratoriyada NGS natijasi bioinformatik tahlil ketma-ketligi va ACMG/AMP mezonlari asosida standart talqin qilinishi kerak [4,7].

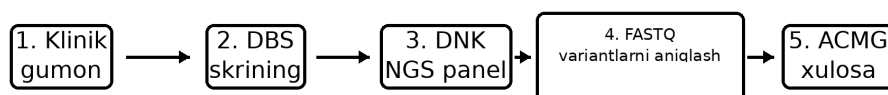
TADQIQOT MAQSADI

Illumina asosidagi NGS texnologiyasi va bioinformatik tahlil bosqichlarining molekulyar-genetik diagnostikadagi o‘rnini yoritish, shuningdek, Fabri kasalligi misolida DBS-biokimyoviy skrining, GLA genini sekvenslash va oilaviy skrining natijalarini grafik hamda jadval ko‘rinishida tahlil qilishdan iborat.

MATERIALLAR VA USULLAR

Fabri kasalligi bo‘yicha tadqiqotda 31 oy davomida 388 yuqori xavf guruhidagi shaxs DBS orqali tekshirilgan. Mualliflar α -Gal A faolligi past bo‘lgan yoki Lyso-GL-3 darajasi yuqori bo‘lgan bemorlarda GLA genining sekvenslash tekshiruvini bajargan. Erkaklarda α -Gal A $<2,40 \mu\text{mol/L/soat}$ bo‘lsa, keyingi bosqichda GLA tahlili va Lyso-GL-3 baholangan; ayollarda esa Lyso-GL-3 $>1,10 \text{ ng/ml}$ bo‘lsa, GLA sekvenslash bajarilgan (1-rasm, 1-jadval).

Illumina va ONT platformalari bo‘yicha tadqiqotda uchta namunada uchta virus va uchta viroid aniqlash imkoniyati baholangan. Illumina NovaSeq X platformasida juft uchli o‘qishlar, $2 \times 150 \text{ bp}$ formatida hosil qilingan; ONT MinION platformasida esa uzun o‘qishlar, shtrix-kodlangan kutubxonalarni birlashtirish va real vaqtga yaqin tahlil imkoniyati ko‘rib chiqilgan.



Natija: erta molekulyar tashxis, oilaviy skrining va individual klinik qaror

1-rasm. Orfan kasalliklar uchun integratsiyalashgan laborator algoritmi: klinik gumon, DBS-biokimyoviy skrining, Illumina NGS va ACMG asosida talqin.

1-jadval

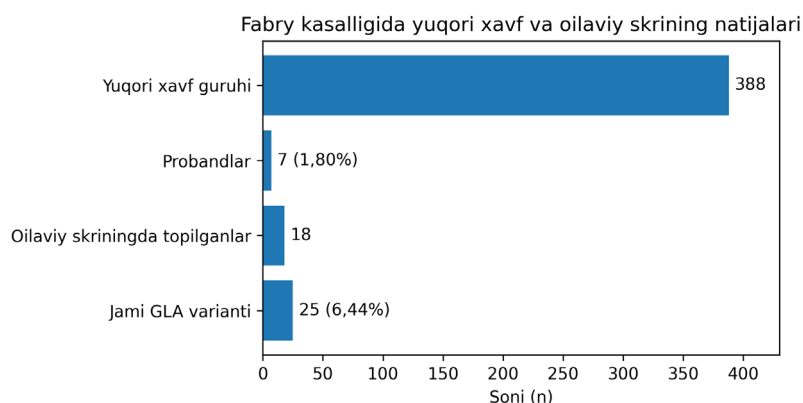
Fabri kasalligi bo‘yicha yuqori xavf guruhlari tanlash mezonlari va tekshirilgan bemorlar soni

Yuqori xavf belgisi	n	Laborator-genetik ahamiyati
Noma'lum etiologiyali surunkali buyrak kasalligi	165	Proteinuriya/gematuriya bilan Fabri ehtimolini baholash
Noma'lum etiologiyali insult	58	Yosh yoki noaniq insultda lizosomal kasallikni istisno qilish
Noma'lum etiologiyali yurak-qon tomir kasalligi	114	LVH, yurak yetishmovchiligi yoki aritmiyada GLA tahlili
Akroparesteziya	38	Periferik nerv zararlaniishi va og‘riq krizlari
Angiokeratoma	4	Klassik fenotipga xos teri belgisi
Gipo/anhidroz	5	Vegetativ nerv tizimi belgisi
Cornea verticillata yoki linza xiralashishi	1	Ko‘z belgisi orqali skrining
Noma'lum etiologiyali qorin og‘rigi/diareya	3	GI tizim zararlaniishi

NATIJALAR VA MUHOKAMA

Adabiyot ma‘lumotlari asosida tuzilgan tahlil shuni ko‘rsatadiki, Fabri kasalligida yuqori xavf guruhlari maqsadli skrining qilish tashxis samaradorligini oshiradi. 388 nafar tekshirilgan shaxs ichidan 7 nafar proband aniqlangan, bu 1,80% diagnostik chiqimga teng. Keyingi oilaviy skrining 18 nafar qo‘shimcha GLA IVS4+919G>A varianti tashuvchisini aniqlagan va umumiy aniqlash ko‘rsatkichi 25/388, ya‘ni 6,44% gacha oshgan (2-rasm).

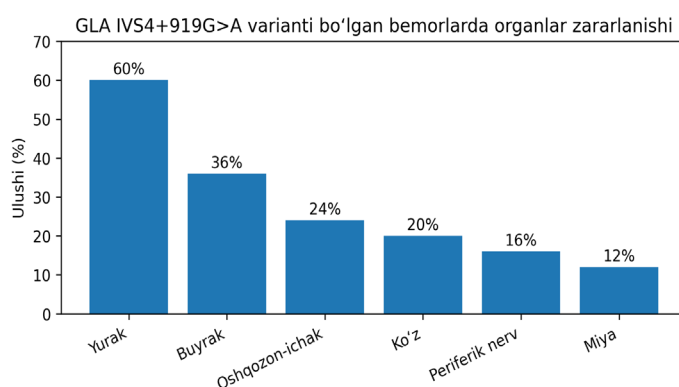
Ushbu natija klinik laboratoriya uchun muhim xulosani beradi: proband aniqlangandan keyin faqat bemorni emas, balki uning biologik qarindoshlarini ham maqsadli tekshirish kerak. X-xromosomaga bog‘liq kasalliklarda erkak bemorlarda ferment faolligi ko‘pincha ancha pasayadi, geterozigot ayollarda esa fenotip yengil yoki kechroq namoyon bo‘lishi mumkin. Shuning uchun ayollarni faqat ferment faolligi bilan baholash ayrim holatlarda yetarli bo‘lmisligi mumkin va Lyso-GL-3 hamda GLA sekvenslash muhim ahamiyatga ega.



2-rasm. Fabry kasalligida yuqori xavf skriningi va oilaviy skrining natijalari.

Tahlil qilingan ma'lumotlarda GLA IVS4+919G>A varianti bo'lgan bemorlarda eng ko'p yurak-qon tomir tizimi zararlanishi kuzatilgan. Yurak zararlanishi 60% bemorlarda qayd etilgan; bu Fabry kasalligining kech boshlanuvchi shakllarida chap qorincha gipertrofiyasi va aritmiyalar bilan namoyon bo'lishi mumkinligini ko'rsatadi. Buyrak zararlanishi 36%, oshqozon-ichak belgilar 24%, ko'z belgilar 20%, periferik nervlar 16% va miya zararlanishi 12% bemorlarda uchragan (3-rasm).

Bu ko'rsatkichlar pediatriya amaliyotida ham ahamiyatli: bolalarda Fabry kasalligi doimo to'liq klassik klinik ko'rinishda boshlanmaydi. Ba'zi hollarda oyoq-qo'llarda og'riq, terlash buzilishi, qorindagi noma'lum og'riqlar yoki oilaviy anamnez dastlabki signal bo'lishi mumkin. Shu sababli laborator yo'llanma formasida klinik belgilar, oilaviy anamnez, qarindoshlar nikohi, yoshi, jinsi va oldingi instrumental tekshiruvlar natijalarini ko'rsatish zarur (2-jadval, 4-rasm).



3-rasm. GLA IVS4+919G>A varianti aniqlangan bemorlarda organlar va tizimlar zararlanishi ulushi.

2-jadval

Fabry kasalligida asosiy laborator markerlar medianasi va klinik talqini

Ko'rsatkich	Erkak Fabri	Erkak nazorat	Ayol Fabri	Ayol nazorat	Talqin
α -Gal A, $\mu\text{mol/L/soat}$	0,74	4,05	1,87	3,96	Ferment faolligi pasayishi Fabry foydasiga
Lyso-GL-3, ng/ml	4,79	0,22	1,01	0,30	Substrat/metabolit oshishi kasallik faolligini ko'rsatadi
Statistik ahamiyat	$p < 0,05$	—	$p < 0,05$	—	Guruhlar orasida ishonchli farq mavjud

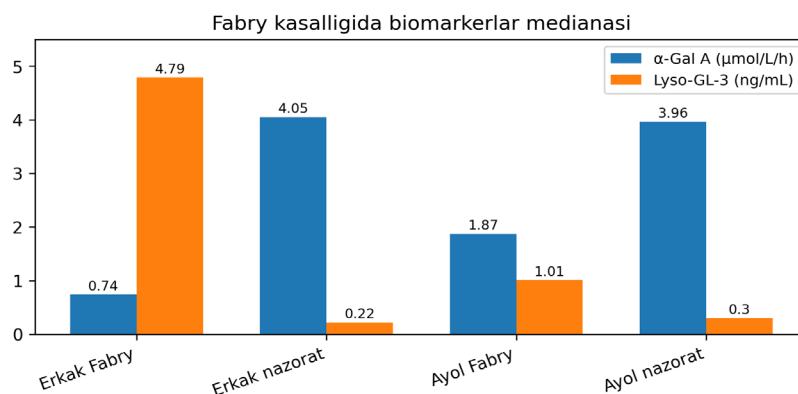
NGS natijalarini klinik talqin qilishda FASTQ fayldan boshlab yakuniy laborator xulosagacha bo'lgan har bir bosqich nazorat qilinishi kerak. Birinchi bosqichda o'qish sifati, adapter qoldiqlari va sekvenslash qamrovi baholanadi. Keyin o'qishlar referens genomga moslashtiriladi, genetik variantlarni aniqlash amalga oshiriladi, variantlar annotatsiya qilinadi va populyatsion chastota, oqsilga ta'sir, oldingi klinik kuzatuvlar hamda bemor fenotipi bilan mosligi ko'rib chiqiladi.

Variantlar ACMG/AMP mezonlari asosida patogen, ehtimol patogen, noaniq klinik ahamiyatli, ehtimol

xavfsiz (likely benign) va xavfsiz (benign) toifalarga ajratiladi [5,7]. Klinik laboratoriya xulosasida faqat variant nomi emas, balki uning zigozlik holati, gen, transkript, nukleotid va oqsil darajasidagi nomenklaturasi, irsiylanish turi hamda tavsiya etiladigan oilaviy tekshiruv ko'rsatilishi kerak. Ayniqsa noaniq klinik ahamiyatli variantlarda yakuniy tashxis qo'yishga shoshilmaslik va qayta interpretatsiya imkoniyatini saqlash muhimdir (3-jadval, 5-rasm).

Klinik genetik diagnostikada Illumina asosidagi NGSning asosiy ustunligi - ko'plab genlarni yuqori aniq-

likda parallel tekshirish imkonidir. Orfan kasalliklarda simptom turli genlardagi variantlar bilan bog‘liq bo‘lishi klinik belgilar ko‘pincha nospetsifik bo‘lib, bir xil mumkin.

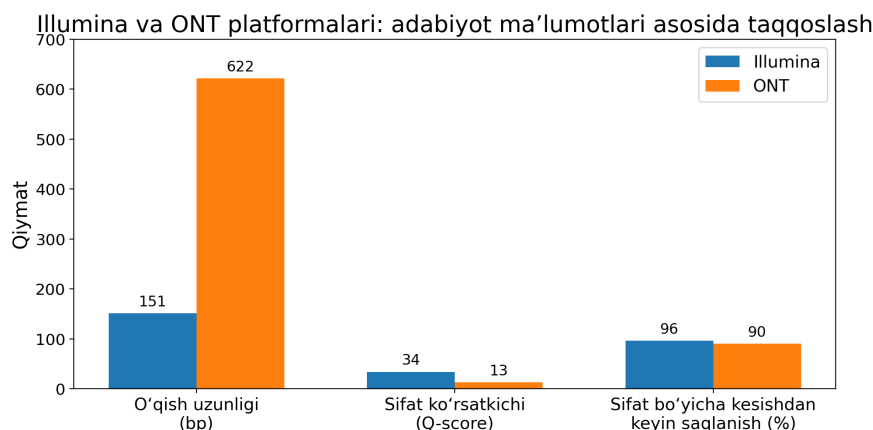


4-rasm. Fabri kasalligida α -Gal A va Lyso-GL-3 median ko‘rsatkichlari. Grafik jadvaldagi ma’lumotlar asosida tuzildi.

3-jadval

Illumina NovaSeq X va Oxford Nanopore MinION platformalarining tanlangan ko‘rsatkichlari

Ko‘rsatkich	Illumina NovaSeq X	ONT MinION	Klinik-laborator xulosa
O‘qish turi	Qisqa juft uchli o‘qishlar, 2×150 bp	Uzun o‘qishlar	Illumina yuqori aniqlik; ONT strukturaviy/tezkor holatlar uchun qulay
O‘rtacha o‘qish uzunligi	151 bp	taxm. 538–694 bp	ONT uzunroq fragmentlarni qamrab oladi
O‘rtacha o‘qish sifati	Q≈34	Q≈13	Illumina xatolik darajasi pastroq
Sifat bo‘yicha kesishdan keyin ma’lumotlarning saqlanishi	96%	90%	Ikkalasi ham sifatli bioinformatik tahlil ketma-ketligini talab qiladi
Amaliy afzallik	Yuqori o‘tkazuvchanlik va qamrov	Portativlik va tezroq natijani olish muddati qisqaroq	Tanlov klinik savol va laborator resursga bog‘liq



5-rasm. Illumina va ONT platformalari ko‘rsatkichlari.

Shu sababli nishon gen paneli yoki ekzom darajasidagi tahlil pediatriya amaliyotida diagnostik yo‘lni qisqartiradi. Biroq NGS yakka holda emas, klinik ma’lumot va biokimyoviy markerlar bilan birgalikda eng yuqori qiymatga ega bo‘ladi. Fabri kasalligi misolida bu yondashuv aniq ko‘rinadi. α -Gal A ferment faolligi erkak bemorlarda juda sezgir marker bo‘lsa-da, ayollarda X-inaktivatsiya sababli natija normal yoki chegaraviy bo‘lishi mumkin. Lyso-GL-3 esa kasallik faolligi va substrat to‘planishini baholashga yordam beradi. GLA genini sekvenslash etiologik tasdiqlashni ta’minlaydi.

Demak, DBS-biokimyo va NGS kombinatsiyasi skriningdan tasdiqlovchi diagnostikagacha bo‘lgan uzluksiz algoritim yaratadi.

Illumina va ONT platformalari taqqoslangan tadqiqotdan olinadigan umumiy saboq shuki, har bir sekvenslash platformasining o‘z kuchli va zaif tomonlari bor. Illumina yuqori qamrov, yuqori sifat va past xatolik darajasi bilan klinik tasdiqlovchi diagnostikaga juda mos keladi. ONT esa uzun o‘qishlar, portativ qurilma va natijani olish muddati qisqaroq bilan ayrim amaliy vaziyatlarda foydali bo‘lishi mumkin. Ammo klinik

laboratoriyada har qanday platforma validatsiya, ichki sifat nazorati va bioinformatik tahlil ketma-ketligi standartlari asosida ishlatilishi kerak [1,6].

Amaliy algoritm

Pediatric markazi molekulyar-genetik laboratoriyasi uchun amaliy algoritm quyidagicha taklif etiladi: klinik gumon va oilaviy anamnezni yig'ish, DBS namunasi orqali ferment/metabolitlarni tekshirish, patologik yoki chegaraviy natijada GLA geni yoki kengroq lizosomal kasalliklar panelini sekvenslash, FASTQ sifat nazorati va genetik variantlarni aniqlash, ACMG/AMP asosida talqin, yakuniy xulosa va oilaviy skrining tavsiyasi.

XULOSA

Illumina asosidagi NGS molekulyar-genetik diagnostikaning yuqori aniqlikka ega, keng qamrovli va klinik jihatdan muhim texnologiyasidir. Pediatric amaliyotida u orfan va irsiy kasalliklarni erta aniqlash, genotip-fenotip mosligini baholash, oilaviy genetik xavfni aniqlash va individual kuzatuv rejasini tuzishda katta ahamiyatga ega.

Fabri kasalligi misolida α -Gal A, Lyso-GL-3 va GLA sekvenslash natijalarining birgalikda qo'llanishi diagnostik samaradorlikni oshiradi. Yuqori xavf guruhlari va oilaviy skrining orqali probanddan tashqari qarindoshlarda ham patogen variantlar aniqlanishi mumkin. Bu esa kasallikni kechikmasdan kuzatish, davolash va genetik maslahat berish imkoniyatini yaratadi.

Sekvenslash platformalari orasida Illumina yuqori qamrov va aniqlik bilan klinik tasdiqlovchi diagnostika uchun muhim o'rin tutadi. ONT kabi uzun o'qishli texnologiyalar esa ayrim sharoitlarda qo'shimcha afzallik berishi mumkin. Eng muhim shart - tanlangan platformani validatsiya qilish, sifat nazoratini yo'lga qo'yish, bioinformatik tahlil ketma-ketligini standartlashtirish va yakuniy natijani klinik kontekstda talqin qilishdir.

ADABIYOTLAR

1. Dippenaar M., Maree H.J., Bester R. From reads to results: comparing Oxford Nanopore to Illumina sequencing for citrus virus surveillance. *BMC Genomics*. 2026;27:277. <https://doi.org/10.1186/s12864-026-12637-7>.
2. Ferreira C.R., Gahl W.A. Lysosomal storage diseases. *Transl Sci Rare Dis*. 2017;2(1-2):1-71.
3. Ge Z., Mao J., Dai Z., Pan X., Lin K., Lu Z. et al. Successful experience with high-risk and family screening for Fabry disease in Ninghai County, Zhejiang Province, Eastern China: genotype-phenotype analysis of the GLA IVS4+919G>A variant. *BMC Med Genomics*. 2026;19:43. <https://doi.org/10.1186/s12920-026-02314-9>.
4. Harrison S.M., Biesecker L.G., Rehm H.L. Overview of specifications to the ACMG/AMP variant interpretation guidelines. *Curr Protoc Hum Genet*. 2019;103(1):e93.
5. Li M.M., Datto M., Duncavage E.J., Kulkarni S., Lindeman N.I., Roy S. et al. Standards and guidelines for the interpretation and reporting of sequence variants. *J Mol Diagn*. 2017;19(1):4-23.
6. Matthijs G., Souche E., Alders M., Corveleyn A., Eck S., Feenstra I. et al. Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. *Eur J Hum Genet*. 2016;24(1):2-5.
7. Richards S., Aziz N., Bale S., Bick D., Das S., Gastier-Foster J. et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the ACMG and AMP. *Genet Med*. 2015;17(5):405-424.
8. Slatko B.E., Gardner A.F., Ausubel F.M. Overview of next-generation sequencing technologies. *Curr Protoc Mol Biol*. 2018;122(1):e59.