На правах рукописи

КОМАРОВА АЛИНА ДМИТРИЕВНА

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ И МАРКЕРОВ ФИБРОЗИРОВАНИЯ У ДЕТЕЙ С БОЛЕЗНЬЮ ВИЛЬСОНА-КОНОВАЛОВА

3.1.21 Педиатрия (медицинские науки)
1.5.7 Генетика (медицинские науки)

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва-2026

Работа выполнена в федеральном государственном автономном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:
доктор медицинских наук, профессор, **Потапов Александр Сергеевич**

доктор биологических наук, доцент **Савостьянов Кирилл Викторович**

Официальные оппоненты:
доктор медицинских наук, профессор РАН, заведующая отделением педиатрической гастроэнтерологии и диетотерапии федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи»

Строкова Татьяна Викторовна

доктор медицинских наук, доцент кафедры молекулярной генетики и информатики, заведующая лаборатории молекулярно-генетической диагностики 3 федерального государственного научного учреждения «Медико-генетический центр имени академика Н.П. Бочкова»

Рыжкова Оксана Петровна

Ведущая организация:
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится « »_____2026 года в « » часов на заседании диссертационного совета 21.1.026.01 при ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России по адресу: 119991 г. Москва, Ломоносовский проспект, 2, стр. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России по адресу: 119991, г. Москва, Ломоносовский проспект, 2, стр. 1 и на сайте http://www.nczd.ru.

Автореферат разослан « »_____2026 года.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор РАН **Винярская Ирина Валериевна**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Болезнь Вильсона–Коновалова (БВК) – редкое мультисистемное наследственное заболевание с аутосомно-рецессивным типом наследования, обусловленное патогенными вариантами в гене *ATP7B*, локализованном на длинном плече хромосомы 13 и кодирующем медь-транспортирующую АТФазу. Нарушение функции этого белка приводит к патологическому накоплению меди в печени, головном мозге, почках и других органах, что без своевременной диагностики и лечения вызывает прогрессирующее поражение тканей органов-мишеней, формируя широкий спектр клинических проявлений (Alkhouri N. et al., 2023, Ghosh U. et al. 2019)

По современным эпидемиологическим данным частота БВК в мире составляет от 1 : 30 000 до 1: 100 000 населения и демонстрирует выраженные этно-географические различия (Ovchinnikova E.V. et al. 2024, Sandahl T.D et al. 2020). В Российской Федерации распространенность варьирует от 0,3 до 1,8 на 100 000 населения (Клинические рекомендации РФ "Нарушение обмена меди" 2024). В последние годы отмечается устойчивая тенденция к увеличению выявляемости БВК, что связано с совершенствованием методов молекулярно-генетической диагностики и ростом настороженности у специалистов.

Особенностью БВК является полиморфизм клинических проявлений и их манифестация в любом возрасте (Alkhouri N. et al., 2023, Chanpong A. et al. 2022). Поздняя диагностика заболевания приводит к формированию необратимых состояний, не поддающихся терапевтической коррекции, и инвалидизации уже в детском возрасте.

Диагностические шкалы играют значительную роль в верификации БВК, однако их информативность зависит от чувствительности и специфичности используемых критериев, доступности лабораторных и инструментальных методов, а также индивидуальных особенностей пациента (Nicastro E. et al. 2010, Wiernicka A. et al. 2017).

Молекулярно-генетическое исследование гена *ATP7B* — единственный метод, позволяющий верифицировать диагноз на доклинической стадии без применения дополнительных методов обследования. Разработка целевых панелей на основе частых мутаций повышает экономическую эффективность скрининга, однако ограниченный охват генетических вариантов снижает в этом случае диагностическую чувствительность по сравнению с более полными, но дорогостоящими методами (секвенирование по Сэнгеру и высокопроизводительное секвенирование). В связи с ограниченной доступностью комплексного молекулярно-генетического исследования в рутинной практике сохраняется актуальность определения наиболее информативных диагностических алгоритмов.

Оптимизация молекулярно-генетической диагностики влияет не только на трудовые и экономические затраты, но и на сроки диагностики БВК и исходы заболевания, а также создает предпосылки для изучения взаимосвязи генотипа и фенотипа, выявление которой может повлиять на прогнозирование течения заболевания.

Одним из ключевых факторов, детерминирующих прогноз заболевания, является прогрессирование фиброза печени с последующим формированием цирроза. Основная роль в его патогенезе отводится миофибробластам, предшественниками которых являются звездчатые клетки. Их активация и пролиферация обусловлены каскадом иммунных реакций, где доминирующим звеном являются цитокины: TGF-β1 и PDGF-BB, VEGF, CTGF (Лебедева Е.И. и др. 2019). Изучение их роли в процессе фиброзирования при различных гепатобилиарных патологиях позволит не только улучшить понимание

механизмов фиброза, но и определить возможность их использования в качестве неинвазивных маркеров его прогрессирования (Roehlen N. et al. 2017).

Степень разработанности темы исследования

Болезнь Вильсона – Коновалова на протяжении последних десятилетий остаётся одной из наиболее изучаемых наследственных патологий обмена меди, однако ряд ключевых аспектов, касающихся ранней диагностики, генетического разнообразия и механизмов прогрессирования поражения печени, по-прежнему недостаточно изучены. Особые трудности представляет диагностика заболевания у детей, в том числе на ранних стадиях его развития, что обусловлено отсутствием классических клинических симптомов и ограниченным спектром лабораторных проявлений.

Для оптимизации диагностики БВК были предложены диагностические шкалы, наиболее распространённой из которых является Leipzig, 2001. Однако, как показали последующие наблюдения, её чувствительность в педиатрической когорте пациентов ограничена, особенно при отсутствии типичных клинических и лабораторных признаков заболевания. Российские исследования у взрослых пациентов продемонстрировали, что диагноз БВК по критериям данной шкалы может быть установлен примерно у 75% больных без подтверждения молекулярно-генетическими методами, в то время как у детей первых пяти лет жизни информативность шкалы во многом определяется результатами генетического исследования (Balashova M.S. et al. 2020, Wiernicka A. et al. 2017). Попытки усовершенствования диагностических критериев привели к разработке модернизированной версии шкалы, однако возможность ее широкого применения, в том числе у детей, требует дальнейшего изучения и клинической валидации (Nagral A. et al. 2019).

В последние годы особое внимание уделяется молекулярно-генетическим аспектам БВК. Во многих странах мира активно проводятся исследования, направленные на изучение спектра мутаций гена *ATP7B* и поиск генотип-фенотипических корреляций при БВК, что является ключом к оптимизации диагностики и прогнозирования течения болезни.

В ряде исследований связи между патогенными вариантами и клиническими проявлениями заболевания установлено не было, тогда как в других были продемонстрированы отдельные закономерности. Так, во Франции выявлена взаимосвязь между нонсенс-мутациями и низким уровнем церулоплазмина, а в Китае - между вариантом *c.2333G>T* и низким уровнем церулоплазмина, вариантами *c.3809A>G, c.2975C>T* и ранним возрастом манифестации, вариантом *c.3884C>T* и печеночными проявлениями (Couchonnal E. et al. 2021, Li M. et al. 2021, Tomić A. et al. 2013).

В России в данной области проведено единственное исследование, по результатам которого установлено, что наибольшие нарушения процессинга белка *ATP7B* вызывают нонсенс-мутации, делеции со сдвигом рамки считывания и мутации сайта сплайсинга (Balashova M.S. et al. 2020). Большинство исследований в данной области проводились среди взрослых пациентов или в смешанных возрастных группах, что существенно ограничивает возможность экстраполяции полученных результатов на детское население.

Наряду с генетическими аспектами, в последние годы активно исследуются механизмы фиброзирования печени при различных гепатобилиарных патологиях. Ключевое значение в этих процессах занимает активация звёздчатых клеток печени и выработка профибротических цитокинов — TGF-β, PDGF-BB, CTGF, VEGF, участвующих в формировании внеклеточного матрикса и ремоделировании паренхимы (Лебедева Е.И. и др. 2019, Roehlen N. et al. 2017).

Роль этих маркеров в прогрессировании фиброза изучена недостаточно, а имеющиеся данные противоречивы. Например, при вирусных гепатитах и МАЖБП TGF-β1 рассматривается как потенциальный предиктор фиброза, однако в других исследованиях его прогностическая ценность не подтверждена (Nelson D. R. et al. 2010, Stättermayer A. F. et al. 2015, Zhang B.-B. et al. 2003). Уровень PDGF-BB в сыворотке крови также снижается по мере прогрессирования фиброза у больных хроническими гепатитами B и C, достигая минимальных значений при циррозе (Haghgoo S. M. et al. 2019). CTGF и VEGF изучены в меньшей степени, однако, учитывая их роль в процессе фиброзирования, они также могут быть рассмотрены в качестве перспективных маркеров прогрессирования фиброза печени.

Таким образом, полиморфизм и неспецифичность симптомов у детей значительно затрудняет раннюю диагностику заболевания без проведения молекулярно-генетического исследования, что приводит к прогрессированию заболевания с формированием необратимых изменений, в том числе фиброза печени. Выявление генотип-фенотипических корреляций, новых неинвазивных маркеров фиброза печени и определение наиболее информативной, доступной в применении диагностической балльной шкалы у детей с БВК позволит своевременно поставить диагноз, начать лечение и мониторировать его эффективность, что может повлиять на прогноз и исход заболевания.

Цель исследования

Определить влияние клинических и молекулярно-генетических показателей, а также маркеров фиброзирования на диагностику и течение болезни Вильсона-Коновалова у детей.

Задачи исследования

1. Установить возрастные особенности клинических проявлений болезни Вильсона-Коновалова у детей.
2. Определить информативность методов диагностики болезни Вильсона-Коновалова и влияющие на нее факторы.
3. Сравнить информативность балльных шкал диагностики болезни Вильсона-Коновалова у детей без учета данных молекулярно-генетического тестирования.
4. Определить спектр и относительные частоты вариантов гена *ATP7B* у российских детей с болезнью Вильсона-Коновалова.
5. Изучить взаимосвязь генотипа и фенотипа болезни Вильсона-Коновалова у педиатрических пациентов.
6. Определить содержание маркеров фиброгенеза (TGF-β, PDGF, CTGF, VEGF) в сыворотке крови при различных стадиях фиброза печени при болезни Вильсона-Коновалова.

Научная новизна

Впервые в Российской Федерации определено, что формирование цирроза печени и неврологических проявлений БВК у детей зависит от возраста пациента на момент диагностики заболевания.

Впервые на выборке из 100 российских детей установлен спектр и относительные частоты вариантов в гене *ATP7B* у детей с БВК. Выявлен всего 51 вариант, из которых 14 вариантов, ранее не упоминались в отечественных и зарубежных источниках литературы: *c.1285+1G>A, c.2866-14T>A, c.2528G>A, c.3533C>G, c.3459G>A, c.3942_3945delinsAG, c.3002T>G, c.1964T>C, c.2815T>A. c.1945C>T, c.1707+2dup, c.1339C>T, c.1_51del, c.3412+1G>A*. Наиболее распространёнными вариантами являлись *c.3207C>A, c.3402del* и *c.3190G>A*, расположенные в экзонах 14 и 15 гена *ATP7B*.

Впервые определена взаимосвязь между генотипом и фенотипом БВК у детей в Российской Федерации: пациенты, имеющие в генотипе на одном или двух аллелях варианты, приводящие к укорочению кодируемого белка, имели достоверно более ранний возраст манифестации и низкий уровень церулоплазмина.

Впервые в педиатрической практике проведена сравнительная информативность различных балльных шкал диагностики БВК без учета молекулярно-генетического исследования. Установлено, что Лейпцигская шкала и модифицированная шкала Nagral A., 2019 могут быть использованы для первичного отбора пациентов на генетическое исследование.

Впервые проведена оценка уровней иммунных сывороточных маркеров фиброзирования (TGF-β, PDGF-BB, CTGF, VEGF) у пациентов с БВК и их взаимосвязь с прогрессированием фиброза печени. Цитокины не позволяют дифференцировать стадии фиброза, но изменения их уровней в динамике отражают активность процессов ремоделирования печеночной ткани.

Теоретическая и практическая значимость

Проведенное исследование расширяет представление о молекулярно-генетических особенностях БВК у российских детей. Определены спектр и относительные частоты вариантов гена *ATP7B* в российской педиатрической популяции и их связь с клиническими проявлениями заболевания, выявлены варианты ранее неописанные в литературе. Установлена информативность диагностических балльных шкал и их критериев в детском возрасте. Доказана значимость молекулярно-генетического исследования в диагностике БВК у детей. Установлена роль профибротических цитокинов (TGF- β, PDGF, CTGF, VEGF) в процессах фиброзирования и их потенциал применения для оценки эффективности терапии.

Внедрение результатов работы в практику

Результаты работы внедрены в практику гастроэнтерологического отделения и Медико-генетического центра Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации, гастроэнтерологического отделения Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Морозовская детская городская клиническая больница Департамента здравоохранения города Москвы», гастроэнтерологического отделения Научно-исследовательского клинического института педиатрии и детской хирургии им. акад. Ю.Е. Вельтищева обособленного структурного подразделения Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России (Пироговский университет), а также в педагогический процесс кафедры детских болезней Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского».

Методология и методы исследования

Во время выполнения работы проводился анализ литературы, изучались клинические и генетические особенности БВК у детей, современные подходы к диагностике заболевания и неинвазивные методы оценки фиброза печени.

В ретроспективную часть исследования было включено 54 ребенка, госпитализированных в гастроэнтерологическое отделение ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России в период с 2012 по 2021 годы в возрасте от 3 лет до 17 лет 11 месяцев с диагнозом БВК, который был установлен на основании клинической картины, результатов лабораторно-инструментальных и молекулярно-генетических методов

исследования в соответствии с клиническими рекомендациями «Нарушения обмена меди (болезнь Вильсона)» МЗ РФ 2024г.

Проспективная часть исследования включала 50 детей в возрасте от 3 лет до 17 лет 11 месяцев в период с 2022 по 2024 годы, которым для окончательной верификации диагноза было проведено молекулярно-генетическое исследование и 63 пациента с уже установленным диагнозом БВК в возрасте от 3 лет до 17 лет 11 месяцев в период с 2022 по 2024 годы, которым проводилась оценка маркеров фиброзирования в крови, из них 17 детей были оценены в динамике через 12 месяцев.

Контрольная группа составила 89 человек с хроническими гепатитами другой этиологии, проходивших обследование в гастроэнтерологическом отделении ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России в период с 2018 по 2022 гг.

Анализ полученных данных проводился с использованием современных статистических методов, включающих описательную статистику, оценку статистической значимости, ROC-анализ, корреляционный анализ.

Положения, выносимые на защиту

1. Клинические проявления болезни Вильсона-Коновалова у детей определяются возрастом. В первой декаде жизни они представлены преимущественно в виде абдоминальной формы, характеризующейся изолированным бессимптомным поражением печени, со второй декады - в отсутствие терапии в ходе естественного течения заболевания прогрессируют фибротические изменения в печени и присоединяется неврологическая симптоматика.
2. Определение сывороточной концентрации церулоплазмина является наиболее независимым от внешних факторов лабораторным методом диагностики болезни Вильсона-Коновалова. Уровень суточной экскреции меди с мочой, в том числе после провокационной пробы Д-пеницилламином, зависит от возраста пациентов и формы заболевания.
3. Постановка диагноза «Болезнь Вильсона-Коновалова» у детей, особенно раннего возраста, на основании стандартных балльных шкал без учета результатов молекулярно-генетического исследования (Лейпцигской и её модификаций) затруднена в связи с ограниченным спектром клинических проявлений БВК и недостаточной информативностью методов диагностики заболевания.
4. Значительная генетическая гетерогенность болезни Вильсона-Коновалова у детей в России, выражающаяся в широком спектре вариантов гена *ATP7B* с наличием уникальных вариантов, а также частота их нахождения в компаунд-гетерозиготном состоянии определяет ограниченность диагностической информативности стандартных ПЦР-панелей «частые мутации» в сравнении с высокопроизводительным секвенированием.
5. Тяжесть молекулярного дефекта в гене *ATP7B* является фактором, определяющим вариабельность клинико-лабораторного фенотипа болезни Вильсона-Коновалова у детей. Варианты, приводящие к укорочению кодируемого белка, обусловливают наиболее грубое нарушение его функции, что проявляется в виде раннего дебюта заболевания и низкой концентрации церулоплазмина.
6. Профиброгенные цитокины (TGF-β, PDGF-BB, CTGF, VEGF) не могут быть использованы для дифференциальной диагностики стадий фиброза печени при болезни Вильсона-Коновалова, однако они перспективны в качестве неинвазивного критерия для объективного мониторинга эффективности проводимой терапии.

Степень достоверности результатов

Основные положения диссертационной работы получены при анализе данных, содержащихся в материалах первичной документации и полностью им соответствуют. Результаты, полученные автором вследствие анализа клинических и молекулярно-генетических данных, свидетельствуют о решении поставленных задач. Достаточно большой объем материала (104 пациента с БВК и 89 пациентов из группы контроля) обусловливает высокую степень достоверности и обоснованности основных научных положений диссертации и выводов. Проанализировано значительное количество современных данных из отечественной и зарубежной научной литературы (более 100 источников). Обработка и интерпретация полученных результатов проведены с использованием современных статистических методов анализа.

Апробация результатов

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на XXX Конгрессе детских гастроэнтерологов России и стран СНГ (15.03.2023), III Всероссийском педиатрическом форуме студентов и молодых ученых с международным участием «Виртуоз Педиатрии» (15.05.2023), V Всероссийской научно-практической конференции «Осенние Филатовские чтения – важные вопросы детского здоровья» (14.09.2023), III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «ORPHA-DA. Редкие болезни: от истоков к перспективам» (16.11.2023); V Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием, посвященной 100-летию со дня рождения академика Митрофана Яковлевича Студеникина (06.12.2023); XXXI Конгрессе детских гастроэнтерологов России и стран СНГ (13.03.2024), 56th European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) Annual Meeting (16.05.2024), V Всероссийском педиатрическом форуме студентов и молодых ученых с международным участием «Виртуоз Педиатрии» (21.05.2024), I Всероссийском форуме с международным участием «Здоровье детей-национальный приоритет России» (27.09.2024), IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «ORPHA-DA. Редкие болезни: от истоков к перспективам» (15.11.2024), XXIII Российском конгрессе «Инновационные технологии в педиатрии и детской хирургии. Конгресс Вельтищева» (24.10.2024), 57th European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) Annual Meeting (17.05.2025), VI Съезде детских врачей московской области с международным участием (04.09.2025), VI Всероссийской научно-практической конференции «Осенние Филатовские чтения – важные вопросы детского здоровья» (26.09.2025), XXIV Российский конгресс «Инновационные технологии в педиатрии и детской хирургии. Конгресс Вельтищева» (24.10.2025), V Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «ORPHA-DA. Редкие болезни: от истоков к перспективам» (14.11.2025).

Публикации

По теме диссертационной работы опубликовано 18 научных работ, из которых 5 статей в изданиях, рекомендованных ВАК РФ для публикаций основных научных результатов, 12 тезисов и 1 глава учебника по педиатрии.

Личный вклад автора

Личный вклад автора состоит в анализе отечественной и зарубежной литературы, определении цели и задач исследования, разработке плана и дизайна исследования, ведении пациентов, проведении молекулярно-генетического исследования и иммуноферментного анализа, в изучении медицинской

документации и ее статистической обработке, участии в научно-практических конференциях, внедрении в клиническую практику разработанных рекомендаций.

Объем и структура диссертации

Текст диссертационной работы изложен на 139 страницах и состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов исследования, 3 глав собственных наблюдений, заключения, выводов и практических рекомендаций. Диссертация иллюстрирована 16 таблицами, 26 рисунками и 2 клиническими примерами. Список использованной литературы включает 144 источника: 27 отечественных и 117 зарубежных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объем и методы исследования

Работа выполнена в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России (Директор – заслуженный врач Российской Федерации, д.м.н., профессор Фисенко А.П.) на базе гастроэнтерологического отделения (начальник центра воспалительных заболеваний кишечника у детей – д.м.н. проф. Потапов А.С.) и лаборатории медицинской геномики (начальник Медико-генетического центра – д.б.н. Савостьянов К.В.). Лабораторное и инструментальное обследование проводилось в централизованной клинико-диагностической лаборатории (заведующая лабораторным отделом – д.м.н. Семикина Е.Л.), лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии (заведующая отделением – к.м.н. Курбатова О.В.), отделении ультразвуковой диагностики (заведующая отделением – Хазыкова Д.В.), лаборатории лучевой и инструментальной диагностики (заведующий отделением – к.м.н. Аникин А.В.), патологоанатомическом отделении (заведующий отделением – Куликов К.А.).

Согласно дизайну, в исследование включено 193 ребенка (рисунок 1).

В ретроспективную часть исследования было включено 54 ребенка, в проспективную часть - 50 детей, которым для окончательной верификации диагноза БВК было проведено молекулярно-генетическое исследование и 63 пациента с уже установленным диагнозом, которым проводилась оценка маркеров фиброзирования в крови, из них 17 детей были оценены в динамике через 12 месяцев. Контрольная группа составила 89 пациентов с хроническими гепатитами другой этиологии: аутоиммунным гепатитом (n=35), overlap-синдромом аутоиммунного гепатита с холангитом (n=13), первичным склерозирующим холангитом (n=8), инфекционными и токсическими гепатитами (n=25), другими наследственными заболеваниями с поражением печени (n=6) и метаболически ассоциированной жировой болезнью печени (n=2). Критерии включения: пациенты с диагнозом БВК в возрасте от 3 до 17 лет 11 месяцев, наличие информированного согласия. Критерии невключения: возраст младше 3 лет и старше 18 лет, отсутствие результатов обследования, включая молекулярно-генетическое исследование, или невозможность их точной интерпретации.

Диагноз устанавливался согласно клиническими рекомендациями «Нарушения обмена меди (болезнь Вильсона)» МЗ РФ 2024г. Клинический и биохимический анализы крови с определением стандартных показателей проводились на анализаторах Mindray BS-800M и Mindray BC-6800Plus (Китай), концентрацию церулоплазмина в сыворотке определяли иммунотурбидиметрическим методом на аппарате Cobas c 311 (Франция), а уровень суточной экскреции меди с мочой и содержание меди в биоптатах печени количественно измеряли методом спектрофотометрии на атомно-абсорбционном спектрофотометре AAnalyst 800 в лаборатории биохимии и молекулярной диагностики на базе ФГБНУ «НИИ медицины труда им. Академика И.М. Измерова».



Рисунок 1. Дизайн исследования: ретроспективно-проспективное нерандомизированное неконтролируемое исследование.

Молекулярно-генетическая диагностика как ретроспективно, так и проспективно проводилась в лаборатории медицинской геномики Медико-генетического центра ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» МЗ РФ, за исключением пациентов, которым выполняли исследование 12 частых мутаций в гене *ATP7B* методом аллель-специфичной ПЦР с гель-электрофорезом. В ретроспективной группе из 54 пациентов, из которой в связи с отсутствием биологического материала и обнаружением только одного гетерозиготного варианта на стадии поиска частых мутаций были исключены 4 ребенка, поиск частых мутаций методом ПЦР проведен у 52% (26/50) детей, биаллельные варианты выявлены у половины из них (13/26); остальным 50% детей с единственным вариантом проведено дополнительное обследование, включавшее секвенирование по Сэнгеру или высокопроизводительное секвенирование (ВПС). В проспективной части (n=50) поиск вариантов проводили путем анализа таргетных кодирующих и прилегающих интронных областей гена *ATP7B* методом ВПС. Выделение геномной ДНК осуществляли на автоматической станции QIAQUBE (QIAGEN, Германия) с помощью набора реактивов DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Германия). Секвенирование проводили на платформах MiSeq и Nextseq 550 (Illumina, Сан-Диего, Калифорния, США), валидацию выявленных вариантов — двунаправленным

секвенированием по Сэнгеру с использованием набора реактивов BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, США) на генетическом анализаторе ABI 3500xl (Thermo Fisher Scientific, США); для валидации протяженной делеции, заподозренной в ходе биоинформатического анализа, применяли ПЦР в реальном времени с интеркалирующим красителем iQ™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, США). Для оценки частот минорных аллелей использовали базу Genome Aggregation Database (gnomAD) NM_000053.4, для определения клинической релевантности — базы OMIM и HGMD® Professional версия 2023.2, а также литературные данные, а для оценки интронных вариантов, расположенных вне канонических сайтов сплайсинга, применяли программы-предсказатели SPiP, SpliceAi и Pangolin.

Во второй части проспективного исследования у 63 детей с установленной БВК в 80 образцах венозной крови методом иммуноферментного анализа определены биомаркеры TGF-β, PDGF-BB и CTGF с использованием наборов RayBio® Human ELISA Kit (США) и VEGF с помощью набора «VEGF-ИФА-БЕСТ» (Вектор-Бест, Россия) по стандартизированной методике. Измерение плотности печени проводили методом непрямой транзиентной фиброэластометрии на аппарате FibroScan® compact 530 (Echosence, Франция), стадии фиброза дифференцировали согласно шкале METAVIR.

Статистическая обработка выполнена с использованием программы IBM SPSS Statistics версии 26.0 (IBM Software, США); нормальность распределения оценивали по критериям Шапиро-Уилка (при числе наблюдений менее 50) и Колмогорова-Смирнова (при числе более 50), количественные переменные с распределением, отличным от нормального, представлены медианой и межквартильным интервалом, а категориальные — в виде абсолютных и процентных долей. Сравнение категориальных данных проводили с помощью четырехпольных таблиц с использованием критериев Фишера и χ^2 Пирсона, для оценки воздействия факторов рассчитывали отношение шансов с 95% доверительным интервалом и определяли связь по V Крамера; для сравнения двух групп по количественному признаку применяли U-критерий Манна-Уитни, трех и более групп — критерий Краскела-Уоллиса, корреляционный анализ выполняли с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена с оценкой тесноты связи по шкале Чеддока, а сравнение связанных совокупностей — с помощью парного критерия Уилкоксона. Диагностическую значимость количественных критериев, оптимальное соотношение чувствительности и специфичности и пороговое значение cut-off определяли с использованием ROC-кривых, при этом уровень статистической значимости принимали при $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клинико-лабораторная характеристика БВК у детей

Всего обследовано 193 ребенка с хроническим гепатитом. Диагноз БВК был установлен у 104 детей, среди них 68% (71/104) мальчиков и 32% (33/104) девочек. У 88,5% (92/104) детей БВК протекала в абдоминальной форме, 10,5% (11/104) - в смешанной форме, у 1 ребенка (1%) БВК диагностирована на доклинической стадии, впоследствии не получавшего терапию и развившего абдоминальную форму. Возраст дебюта заболевания варьировал от 3 лет до 16 лет (медиана 6,6 [4,6;10] лет), медиана возраста постановки диагноза составила 9,2 [6,3;11,7] лет. В возрасте 5-10 лет БВК манифестировала у 43% (45/104) пациентов, диагностирована у 47% (49/104) детей. Несмотря на то, что у 31% (32/104) первые клинические проявления были обнаружены в раннем детстве (до 5 лет), установить диагноз в этом возрасте удалось лишь у 12% (12/104) детей (рисунок 2), что позволяет отнести их к

труднодиагностируемой группе пациентов. Медиана длительности наблюдения от появления первых симптомов до диагностики БВК составила 10 [4,2;34,5] месяцев.

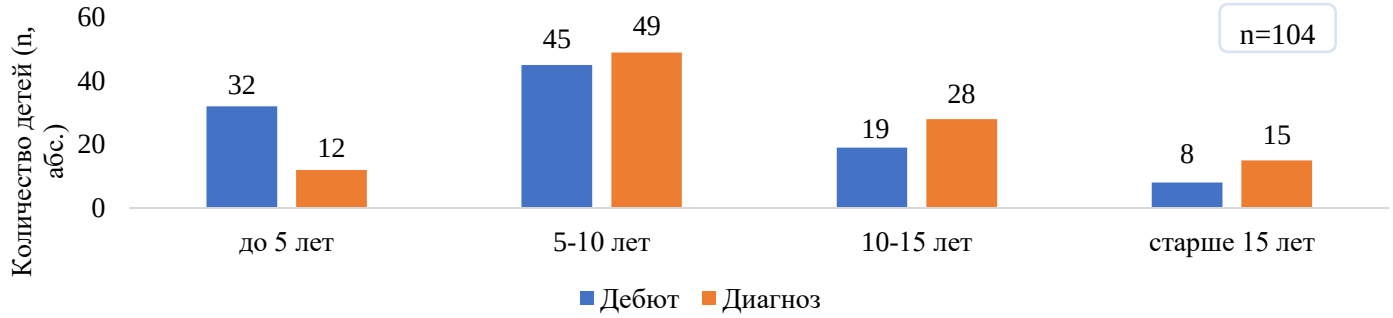


Рисунок 2. Возраст дебюта и постановки диагноза БВК у детей в различных возрастных группах.

Наиболее частым клиническим проявлением БВК была гепатомегалия, встречавшаяся у 48% (50/104) детей, следующими по частоте был абдоминальный болевой синдром – 33% (34/104), остальные клинические проявления встречались с частотой менее 8%.

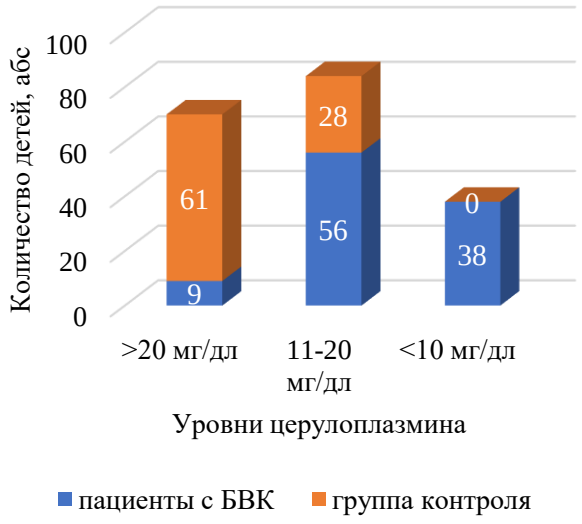
У подавляющего большинства пациентов (96%, 100/104) основным лабораторным проявлением был цитолиз (медиана АЛТ - 189 [88,9;277] Ед/л и АСТ - 96,5 [65,5;163,7] Ед/л), и холестаз, обнаруженный у 69% (72/104) детей (медиана ГГТ составила 49,5 [35,4;73] Ед/л). У 21,1% (22/104) больных зафиксированы гиперхолестеринемия и гипертриглицеридемия.

Цитопения, анемия, гипопротеинемия, гипоальбуминемия, гипербилирубинемия встречались только у пациентов с циррозом печени.

Сравнительная оценка информативности лабораторных, инструментальных методов и диагностических балльных шкал у детей

Первоначальная диагностика БВК заключалась в определении концентрации церулоплазмина (n = 103) в сыворотке крови, медиана составила 11 [5,9;15,1] мг/дл. У 54% (56/103) пациентов уровень церулоплазмина находился в диапазоне 11–20 мг/дл, у 37% (38/103) был <10 мг/дл, а у 9% (9/103) больных – в пределах нормальных значений (рисунок 3А).

А



Б

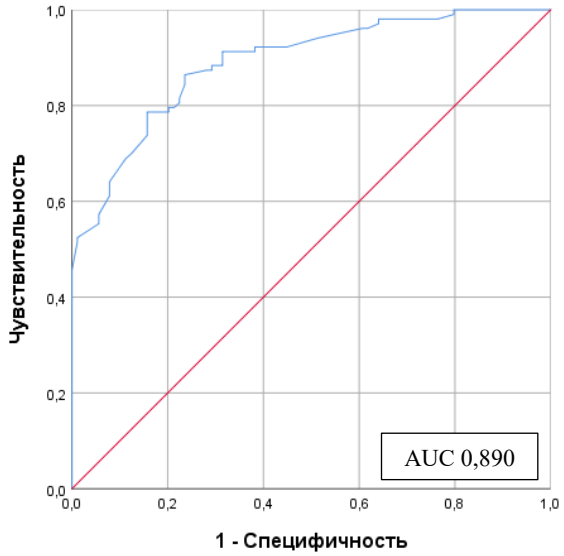


Рисунок 3: А- концентрация церулоплазмина у пациентов с БВК и в группе контроля; Б- результат ROC-анализа, показывающий возможность диагностики БВК у детей с помощью церулоплазмина.

Не было выявлено статистически значимых различий в уровнях данного маркера между возрастными группами на момент диагностики БВК (p=0,965), а также между пациентами с абдоминальной и смешанной формой, 11 [5,9; 15,05] мг/дл и 11 [5,9; 16,9] мг/дл соответственно (p = 0,966).

В группе контроля (n = 89) концентрация церулоплазмина была значительно выше и составила 23,0 [18;27] мг/дл (p<0,001). Только у 31% (28/89) детей уровень церулоплазмина находился в диапазоне 11–20 мг/дл (рисунок 3А).

Площадь под ROC-кривой составила 0,890 [0,846; 0,934], полученная модель была статистически значимой (p<0,001). Наиболее оптимальным соотношением чувствительности 81,6% и специфичности 79,8% обладало пороговое значение 16,9 мг/дл (рисунок 3Б).

Медиана суточной экскреции меди в моче (n=96) составила 90,6 [55,1;153,2] мкг/сут. У большинства (54/96, 56,2%) пациентов с БВК уровень меди в моче находился в пределах нормальных значений или в диапазоне 50-100 мкг/сут, и лишь у 43,8% (42/96) отмечалось диагностически значимое (>100 мкг/сут) повышение меди. Установлена значимая прямая умеренная корреляционная связь по шкале Чеддока между уровнем меди в моче и возрастом пациентов на момент диагностики БВК (r_{xy}= 0,315, p= 0,002).

При сравнении уровня суточной экскреции меди с мочой у пациентов в зависимости от возраста было выявлено, что у детей с установленным диагнозом БВК в раннем возрасте (5 лет, n=11) значения были значимо ниже в сравнении с пациентами с установленным диагнозом в подростковом возрасте (после 15 лет), 54 [35,8; 68,8] мкг/сут и 194 [86,1; 345,0] мкг/сут соответственно (p = 0,002) (рисунок 4А).

А Б

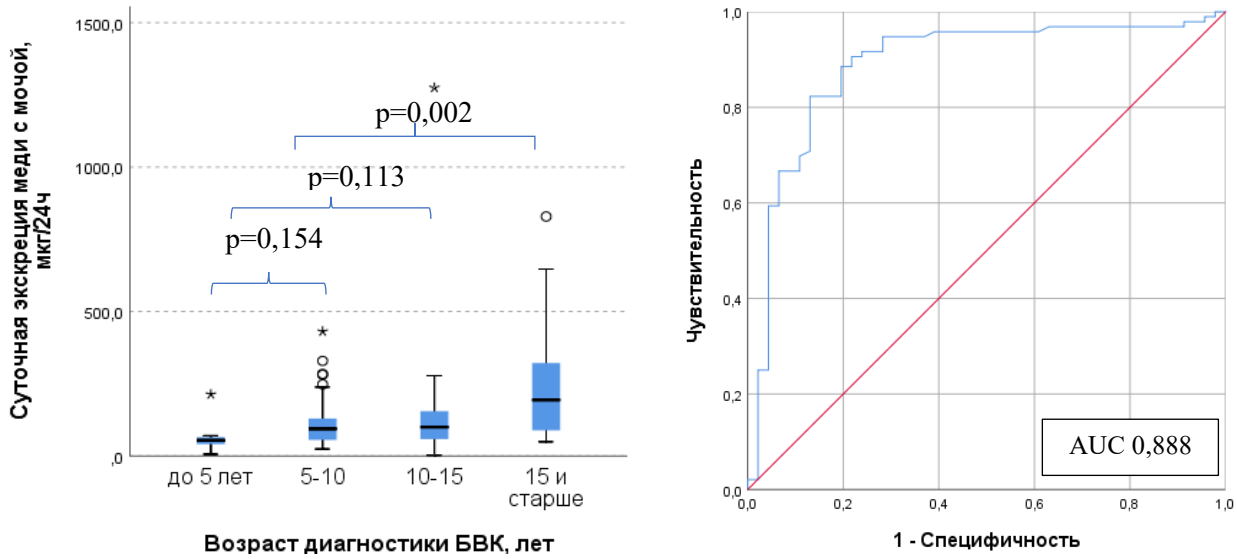


Рисунок 4: А - показатели уровня суточной экскреции меди с мочой у пациентов с БВК различных возрастных групп; Б- результат ROC-анализа, показывающий возможность диагностики БВК у детей с помощью суточной экскреции меди с мочой.

Уровень меди в суточной моче был значимо выше у пациентов со смешанной формой заболевания (n=11) в сравнении с абдоминальной (n=93), 321,5 [199,0; 521,5] мкг/сут и 89,3 [54,5; 131,0] мкг/сут соответственно (p < 0,001).

В контрольной группе (n = 46) суточная экскреция меди составила 18,5 [13,0; 30,4] мкг/сут и была значимо ниже в сравнении с пациентами с БВК (p<0,001). Площадь под ROC-кривой, соответствующей взаимосвязи наличия БВК и уровня меди в суточной моче, составила 0,888 [0,823; 0,952]. Полученная модель была статистически значимой (p <0,001). Оптимальным соотношением чувствительности 82,3% и специфичности 87% обладало пороговое значение 50,8 мкг/сут (рисунок 4Б).

Проба с Д-пеницилламином проведена 54 детям, медиана составила 806,8 [475,55; 1184,0] мкг/сут. Была установлена статистически значимая прямая слабой силы связь уровня меди в моче после провокационного теста между возрастом пациентов на момент постановки диагноза (r_{xy}= 0,287, p = 0,047) и прямая умеренной силы связь с нативным уровнем суточной экскреции меди в моче (r_{xy}= 0,342, p = 0,011).

Получены значимые различия уровня меди в моче после пробы с Д-пеницилламином в зависимости от нативной суточной экскреции меди с мочой (p=0,027). Установлено, что наиболее значимое увеличение концентрации меди после провокационной пробы отмечается у пациентов с высокой суточной экскрецией меди с мочой (>100 мкг/сут) по сравнению с группой детей, имеющих нормальный уровень меди в суточной моче (p=0,025).

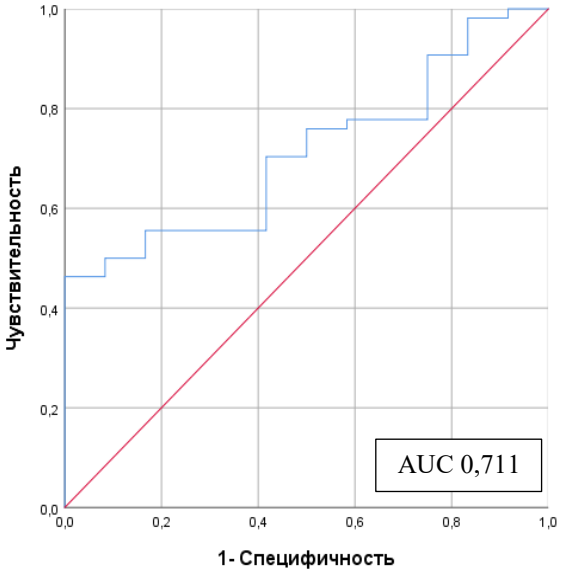


Рисунок 5. Результат ROC-анализа, показывающий возможность диагностики БВК у детей с помощью пробы с Д-пеницилламином.

В контрольной группе (n = 12) уровень суточной экскреции меди после пробы с Д-пеницилламином составил 507,7 [321,5; 761,5] мкг/сут и был значимо ниже в сравнении с пациентами с БВК (p = 0,023). Площадь под ROC-кривой, соответствующая взаимосвязи наличия БВК и пробы с Д-пеницилламином, обладала умеренной предсказательной способностью (AUC = 0,711 [0,577; 0,846]).

Хотя полученная модель была статистически значимой (p = 0,023), добиться высоких показателей чувствительности и специфичности не удалось. Уровень более 250 мкг/сут обладал высокой чувствительностью (92%) и низкой специфичностью (18%), значения более 1600 мкг/сут характеризовались 100% специфичностью и низкой чувствительностью (16%). Оптимальным было значение 557 мкг/сут, при котором чувствительность составила 70,3%, а специфичность - 50,8% (рисунок 5).

В 10,6% (11/104) случаев у пациентов диагностирована смешанная форма БВК: из них у 64% (7/11) отмечалась неврологическая симптоматика (тремор, дизартрия, микрография, снижение когнитивных функций), у 71,5% (5/7) пациентов в данной группе были выявлены характерные изменения в головном мозге при проведении МРТ. У 36,3% (4/11) детей были выявлены только МР-признаки накопления меди в головном мозге.

У пациентов с неврологическим изменениями и циррозом печени медианы возраста дебюта и постановки диагноза БВК были значимо выше, чем в группе детей с отсутствием данных проявлений (таблица 1), что может свидетельствовать о влиянии длительности периода естественного накопления меди на формирование фенотипа.

Частота развития неврологических изменений у пациентов с циррозом печени составила 54,5% (6/11 детей), в сравнении с группой пациентов, у которых диагностирована абдоминальная форма БВК 5,4% (5/93 детей). Шанс поражения нервной системы у больных с циррозом печени в 21,1 раз выше (95% ДИ: 4,75-93,8). Между сопоставляемыми признаками отмечалась относительно сильная связь (V=0,492).

Кольца Кайзера-Флейшера были выявлены у 14,2% (13/91) детей. Частота их обнаружения среди пациентов с абдоминальной формой составила 9,7% (9/84), а со смешанной формой - 36,4% (4/7), полученные различия были статистически значимыми (p=0,03). Шансы обнаружения колец Кайзера-

Флейшера увеличивались у детей с поражением нервной системы в 5,3 раз (95% ДИ: 1,30-21,7). Нами не было выявлено статистически значимых различий в возрасте детей с наличием или отсутствием данного симптома.

Таблица 1. Возрастные параметры у пациентов с различными формами БВК и степенью фиброза печени.

Показатели	Группа детей с БВК (n=104)					
	Неврологические проявления		p	Цирроз печени		p
	Есть (n=11)	Нет (n=93)		Есть (n=11)	Нет (n=93)	
Возраст дебюта БВК, лет	9 [5,5;12,8]	6,3 [4,6;9,7]	0,081	12,8 [10,1;15,3]	6 [4,5;9,2]	<0,001
Возраст постановки БВК, лет	12,9 [10,3;16,4]	9 [6,2;10,9]	0,003	15,6 [12,9;16,5]	8,5 [6;10,8]	<0,001

Согласно Лейпцигской шкале диагностики БВК, установить диагноз, набрав 4 и более баллов, без проведения молекулярно-генетического исследования удалось 41,3% (43/104) пациентам, у 38,5% (40/104) обследуемых заболевание было вероятно (3 балла), а у 20,2% (21/104) - не установлено (2 и менее баллов).

В группе пациентов, набравших 4 балла, у 46,5% (20/43) балл был повышен за счет положительной пробы с Д-пеницилламином и у 25% (5/20) из них также были выявлены кольца Кайзера-Флейшера. В случае, когда офтальмологический симптом отсутствовал (66,6%; 10/15) диагноз можно было установить только с использованием скрининговых тестов, из них у 4 (40%) детей можно было бы избежать проведения биопсии печени.

В группе детей, у которых проба с Д-пеницилламином не проведена или была малоинформативна, наиболее значимым диагностическим параметром стало обнаружение колец Кайзера-Флейшера, наличие неврологических симптомов или изменений в головном мозге по данным МРТ.

Наибольшее число пациентов с установленным диагнозом было в группе детей младшего школьного возраста (41%, 20/49) и старше 15 лет (53%, 8/15). По мере взросления отмечается значимое уменьшение числа пациентов с маловероятным или не установленным диагнозом, что связано с расширением спектра клинических проявлений и нарастанием степени их тяжести (рисунок 6).

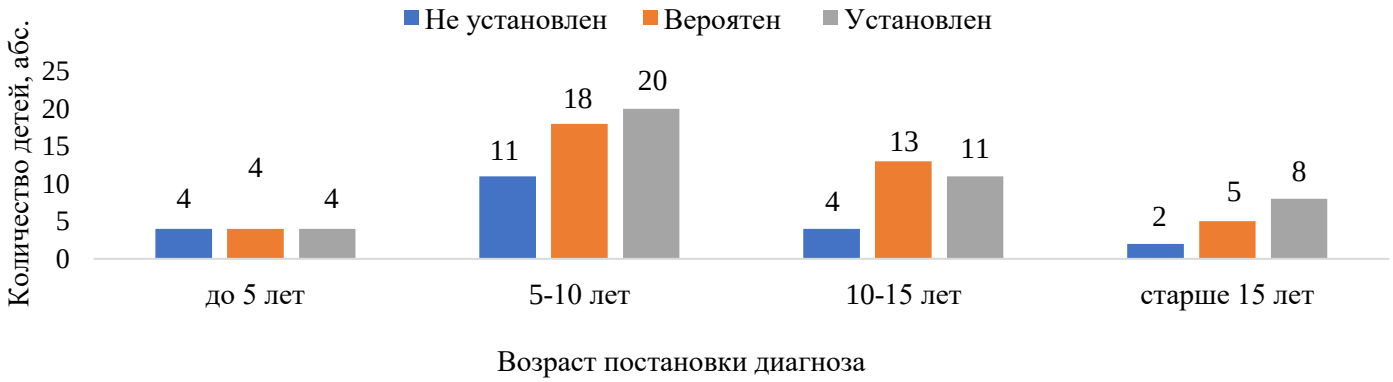


Рисунок 6. Диагностика БВК в различных возрастных группах согласно Лейпцигской шкале.

Данный диагностический алгоритм без учета молекулярно-генетического исследования обладает высокими уровнями специфичности и прогностической точности 100%, однако, ввиду низкой чувствительности диагностических критериев может приводить к ложноотрицательным результатам - 41,3%.

При использовании предложенной Nagral A. шкалы, из которой исключены проба с Д-пеницилламином, определение содержания меди в ткани печени, а также приведена отличная от Лейпцигской шкалы балльная градация уровней церулоплазмина и добавлен критерий отягощенного

семейного анамнеза по БВК, было получено сходное распределение: диагноз установлен (4 и более баллов) у 46,2% (48/104) детей, вероятен (3 балла) у 29,8% (31/104), а у 24% (25/104) пациентов не установлен (2 и менее баллов).

В отличие от Лейпцигской балльной шкалы, при анализе информативности шкалы Nagral A. в различных возрастных группах выявлено некоторое увеличение числа пациентов старше 15 лет с неустановленным диагнозом (33%, 5/15 против 13%, 2/15) и пациентов с установленным диагнозом в группе детей до 5 лет (50%, 6/12 против 33%, 4/12) (рисунок 7).

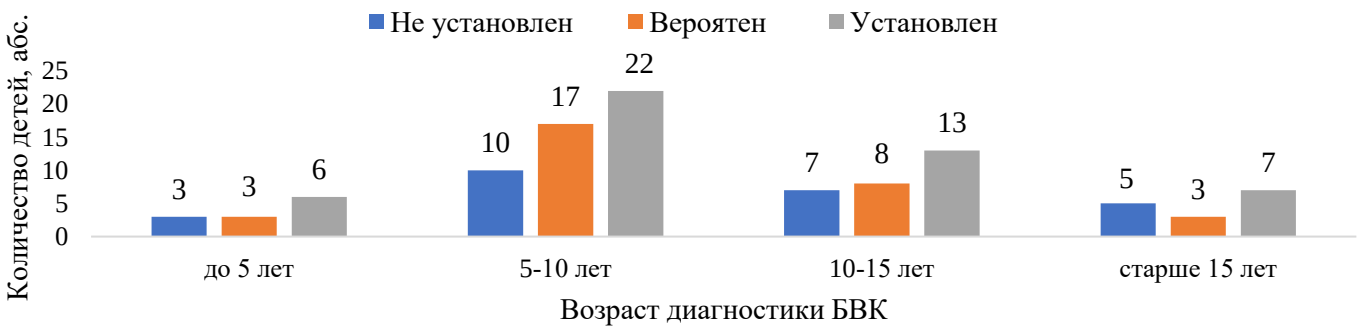


Рисунок 7. Диагностика БВК в различных возрастных группах согласно шкале Nagral A.

Преимущество данной шкалы у детей раннего возраста, заключалось в предложенной балльной градации церулоплазмина и включении отягощенного наследственного анамнеза.

Исключение из модернизированной шкалы пробы с Д-пеницилламином уменьшило число с детей с вероятным диагнозом БВК в контрольной группе до 2 детей (6%) и позволило незначительно повысить чувствительность до 46,1%, при условии сохранения высоких уровней специфичности и прогностической точности 100%.

Спектр и относительные частоты вариантов гена *ATP7B* у российских детей с БВК

Всем детям проведено молекулярно-генетическое исследование, по результатам которого у 96% (100/104) были обнаружены биаллельные варианты в гене *ATP7B*: у 71% (71/100) детей – в компаунд-гетерозиготном состоянии, у 29% (29/100) – в гомозиготном состоянии.

По результатам молекулярно-генетического исследования всего был выявлен 51 вариант в гене *ATP7B*. Наиболее распространенным вариантом оказался *c.3207C>A, p.(His1069Gln)*, аллельная частота которого составила 45,5% (91/200): у 35,8% (24/67) пациентов выявлен в гомозиготном состоянии, а у 64,2% (43/67) в компаунд-гетерозиготном состоянии с иными вариантами.

Вторым по аллельной частоте оказался вариант *c.3402del, p.(Ala1135Glnfs*13)*- 6,5%, обнаруженный у 12 (12%) детей: в 91,7% (n=11) случаев в компаунд-гетерозиготном состоянии и в 8,3% (n=1) - в гомозиготном состоянии.

Патогенный вариант *c.3190G>A, p.(Glu1064Lys)* выявлен у 13% пациентов, а *c.2304insC, p.(Met769Hisfs*26)* - у 11% детей, аллельные частоты составили 6% и 5,5% соответственно. Оба варианта были обнаружены в компаунд-гетерозиготном состоянии с другими вариантами во всех случаях. Остальные варианты были обнаружены с относительными частотами, не превышающими 5%.

Большинство выявленных вариантов (86%; 44/51) встречались с относительными частотами менее 2%. В общей сложности нам удалось выявить 14 новых вариантов, которые не были описаны в мире ранее (27,4%; аллельная частота 9%, 18/200) (таблица 2).

Таблица 2. Патогенность вариантов, не описанных в литературе ранее.

Нуклеотидный вариант, белковый вариант	Патогенность*
c.2528G>A, p.(Gly843Glu)	Вероятно патогенный PM1 PM2 PM3 PM5 PP2 PP3 PP4
c.3533C>G, p.(Thr1178Arg)	Вероятно патогенный PM1 PM2 PM3 PM5 PP2 PP3 PP4
c.3459G>A, p.(Trp1153)*	Патогенный PVS1 PM2 PM3 PP4
c.1339C>T, p.(Gln447)*	Патогенный PVS1 PM2 PM3 PP4
c.1707+2dup	Патогенный PVS1 PM2 PM3 PP4
c.1945C>T, p.(Gln649)*	Патогенный PVS1 PM2 PM3 PP4
c.3412+1G>A	Патогенный PVS1 PM2 PM3 PP4
c.1285+1G>A	Патогенный PVS1 PM2 PM3 PP4
c.1964T>C, p.(Leu655Pro)	Вероятно патогенный PM1 PM2 PM3 PP2 PP3 PP4
c.2815T>A, p.(Trp939Arg)	Вероятно патогенный PM1 PM2 PM3 PP2 PP3 PP4
c.2866-14T>A	Вероятно патогенный PM2 PM3 PP3 PP4
c.3002T>G, p.(Val1001Gly)	Вероятно патогенный PM1 PM2 PM3 PP2 PP3 PP4 PP5
*c.3942_3945del, p.(Lys1315Glyfs*14)*	Патогенный PVS1 PM2 PM3 PP4
c.1_51del, p.M1_K17del	Патогенный PVS1 PM2 PM3 PP4
Примечание: *- оценка патогенности проводилась согласно руководству по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования	

У большинства пациентов (57%) хотя бы на одном аллеле были обнаружены нонсенс-варианты, варианты со сдвигом рамки считывания или варианты, приводящие к нарушению сайта сплайсинга.

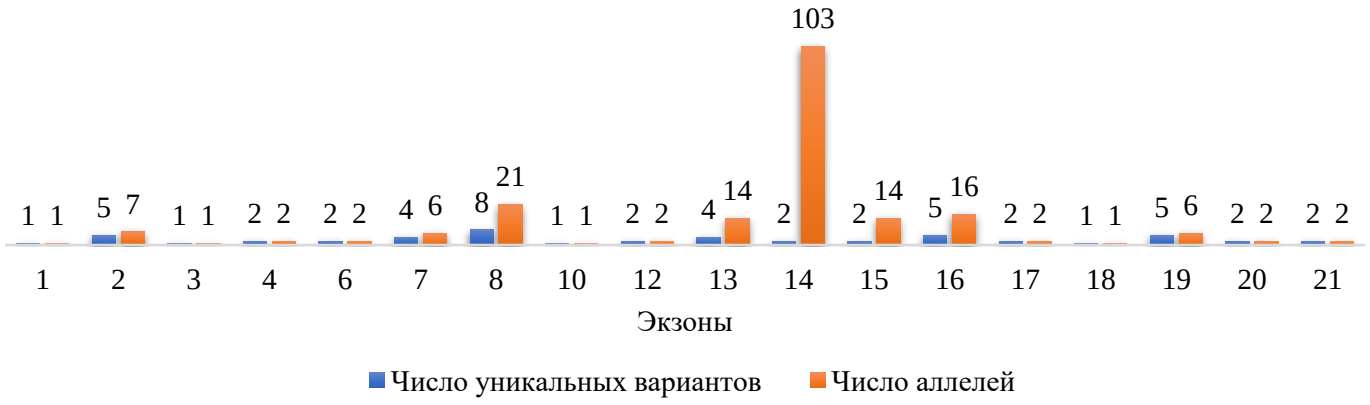


Рисунок 8. Распределение числа выявленных аллелей и числа уникальных вариантов в различных экзонах гена *ATP7B* у российских детей с БВК.

Патогенные и вероятно патогенные варианты были обнаружены во всех экзонах гена *ATP7B* кроме экзонов 5, 9 и 11. Подавляющая доля выявленных аллелей (62%; 124/200) была сконцентрирована в

экзонах 8 и 14, что подтверждает статус основных «горячих точек» гена, расположенных в них. Значительно ниже доля аллелей, выявленных в экзоне 13 (7%; 14/200), в экзоне 15 (7%; 14/200) и в экзоне 16 (6,5%; 13/200). Анализ относительных частот вариантов подтвердил, что на экзон 8 приходится наибольшее разнообразие выявленных вариантов (15,6%; 8/51). Наряду с этим, значительное число различных вариантов выявлено в экзонах 2, 16 и 19 (по 9,8%; 5/51 на каждый экзон) (рисунок 8).

Среди патогенных вариантов, включенных в панель из 12 частых мутаций, в исследуемой когорте детей было обнаружено лишь 4 варианта: *c.3207C>A, c.3402del, c.2304insC, c.3649_3654del*. В гомозиготном состоянии были обнаружены варианты *c.3207C>A* и *c.3402del,* у 35,8% (24/67) и 8,3% (1/12) пациентов соответственно, остальные варианты находились только в компаунд-гетерозиготном состоянии.

Предложенная в отечественном исследовании методика ARMS-ПЦР (DreamTaq Green PCR Master Mix) охватывает 14 частых патогенных вариантов гена *ATP7B*. В нашей выборке в спектре выявленных вариантов присутствовали *c.3207C>A, c.3402del, c.2304insC, c.3190G>A, c.2128G>A* и *c.2333G>T*.

Расчетная выявляемость вариантов различных генетических методов диагностики основывалась на обнаружении биаллельных вариантов, результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3. Расчетная выявляемость различных генетических методов диагностики.

Методы молекулярно-генетической диагностики	Расчетная выявляемость (%)
Аллель-специфичная ПЦР «12 частых мутаций»: *c.1340_1343del, c.1770incT,* ***c.2304insC****, c.2532delCA, c.3026_3028del, c.3029insT, c.3031insC,* ***c.3207C>A****,* ***c.3402del****, c.3627_3630del,* ***c.3649_3654del****,* c.[3942delAT;3947del]	39%
ARMS-ПЦР 14 частых мутаций: ***c.3207C>A****,* ***c.3402del****,* ***c.2304insC****,* ***c.3190G>A****,* ***c.2128G>A****, c.2230T>C,* ***c.2333G>T****, c.3121C>T, c.1847G>A, c.2332C>G, c.2336G>A, c.2501T>A, c.2827G>A, c.3222_3243+21del43*	46%
Секвенирование по Сэнгеру экзонов 8,13-16	67%
ВПС	99%

Наименее эффективным по расчетной выявляемости был метод, направленный на детекцию 12 частых мутаций, что свидетельствует о том, что фрагментарный анализ, не охватывающий критически важные участки гена, принципиально ограничивает информативность. Более высокая, но всё же неоптимальная выявляемость (46%) достигается при применении панели 14 частых мутаций, включающей не только большее число вариантов, но и те варианты, которые чаще встречаются в нашей стране. В отличие от них, исследование ключевых экзонов (8, 13-16) методом прямого секвенирования по Сэнгеру показало более высокую диагностическую эффективность с расчётной выявляемостью 67%.

Анализ генотип-фенотипических взаимосвязей при БВК у детей

Описано, что мажорный вариант *c.3207C>A*, ассоциирован с более ранним дебютом и легким течением с изолированным поражением печени, в связи с чем была проведена оценка взаимосвязи фенотипа с генотипом, определяющегося по наличию в нем данного варианта в гомозиготном состоянии.

Смешанная форма БВК встречалась с одинаковой частотой во всех группах, однако цирроз печени встречался чаще у пациентов, имевших в генотипе один или оба варианта отличных от мажорного, 45,5% (5/11) и 36,4% (4/11) соответственно (таблица 4).

Таблица 4. Распределение пациентов по мажорной мутации, фенотипам БВК и тяжести поражения печени.

Фенотипический признак		n	*c.3207C>A/ c.3207C>A*	*c.3207C>A*/ Другой вариант	Другой вариант/ Другой вариант	p
Форма БВК абс., (%)	Печеночная	89	19 (21,3)	40 (44,9)	30 (33,7)	0,536
	Смешанная	11	4 (36,4)	4 (36,4)	3 (27,3)	
Цирроз печени абс., (%)	Есть	11	2 (18,2)	5 (45,5)	4 (36,4)	0,917
	Нет	89	21(23,6)	39 (43,8)	29 (32,6)	
Кольца Кайзера-Флейшера абс., (%)	Есть	11	3 (27,3)	4 (36,4)	4 (36,4)	0,859
	Нет	89	20 (22,5)	40 (44,9)	29 (32,6)	

Также выявлено увеличение частоты раннего дебюта у пациентов, у которых мажорный вариант отсутствовал или был только на одном аллеле, 24,4% (14/33) и 22,7% (12/44) соответственно (таблица 5).

Таблица 5. Распределение пациентов по мажорной мутации и возрасту дебюта БВК.

Группы пациентов в зависимости от генотипа	n	Возраст манифестации, абс., (%)				p
		До 5 лет	5 – 10 лет	10-15 лет	Старше 15 лет	
c.3207C>A/c.3207C>A	23	4 (17,3)	11 (24,8)	4 (17,3)	4 (17,3)	0,198
c.3207C>A/Другой вариант	44	12 (22,7)	19 (43,1)	9 (20,4)	4 (9,0)	
Другой вариант/Другой вариант	33	14 (24,4)	13 (39,3)	6 (18,1)	0 (0)	

Нами было обнаружено, что пациенты с вариантом *c.3207C>A* на двух аллелях демонстрируют достоверно более высокий уровень церулопзамина 16,5 [13,8;23,5] мг/дл, в сравнении с группой детей, имеющих мажорный вариант на одном аллеле - 12,0 [10,0,8;14,8] мг/дл (p=0,027), и детьми, обладающими любыми другими вариантами на обоих аллелях - 3,5 [2,0;6,0] мг/дл (p<0,001).

Дальнейший анализ взаимосвязи фенотипа и генотипа проводился между группами, которые были разделены по генотипу в зависимости от типа мутации:

Группа 1 – пациенты, имеющие хотя бы на одном аллеле вариант, приводящий к укорочению кодируемого белка (Г1).

Группа 2 -пациенты, имеющие на обоих аллелях варианты, не приводящие к укорочению кодируемого белка (Г2).

В группе 1 БВК манифестировала достоверно раньше - 5,6 [4,0;10,0] лет, в сравнении с группой 2 - 8 [5,5;10,3] лет (p=0,035). В общей выборке пациентов БВК чаще манифестировала в возрасте 5-10 лет, однако дебют до 5 лет чаще наблюдался у пациентов с генотипом Г1 - 66,7% (20/30), в сравнении с Г2 - 22,4% (10/30) (p=0,018). Нами не выявлено достоверных различий между группами 1 и 2 по частоте формирования цирроза печени, неврологической симптоматики и колец Кайзера-Флейшера. Однако у пациентов из группы 1 наблюдались достоверно более низкие значения церулоплазмина 8,3 [2,6;13,0] мг/дл по сравнению с пациентами из группы 2 - 14,0 [10,8;17,0] мг/дл (p<0,001).

Взаимосвязь уровня сывороточных биомаркеров фиброзирования со стадией фиброза печени при БВК

Исследование маркеров фиброзирования проводилось в 80 образцах крови пациентов с диагнозом БВК в возрасте от 3 до 17 лет и 11 месяцев, Me – 12,45 [10,4; 14,97] лет. Среди всех детей 11,3% (9/80) пациентов обследовались до начала терапии, 88,7% (71/80) пациентов получали урсодезоксихолевую кислоту, Д-пеницилламин и цинка сульфат в различных комбинациях. Распределение пациентов по стадиям фиброза представлено на рисунке 9.

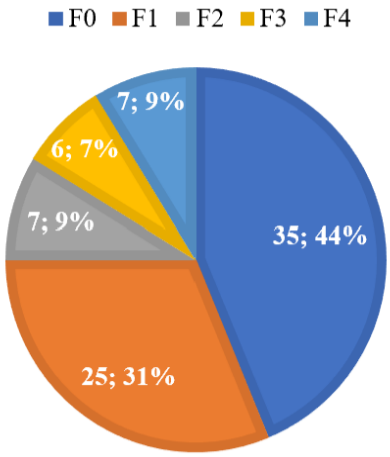


Рисунок 9. Распределение пациентов с БВК по стадиям фиброза печени.

Уровень TGF-β был значимо ниже при F4 в сравнении с F0, 16608 [10608;22972] пг/мл и 50620 [43230;59252] пг/мл соответственно (p<0,001). Наибольшие различия наблюдались между группами F0–F4 (p<0,001) и F1–F4 (p<0,001).

Аналогичные различия выявлены для PDGF-BB: 14736 пг/мл [12800,8;15712] при F0 до 10839 пг/мл [4497,8;17368,8] при F4 (p=0,033), с значимыми различиями между F1 и F4 (p=0,047).

Концентрация CTGF также была более низкой при циррозе печени в сравнении с отсутствием фибротических изменений, 11 [3,8;47,7] нг/мл и 73 [41,9;153] нг/мл соответственно (p=0,001), с наибольшими различиями между F0–F4 (p=0,008) и F0–F3 (p=0,033). Однако CTGF находился в пределах референсных значений при всех стадиях фиброза, в отличие от TGF-β, PDGF-BB, концентрации которых были выше референсных значений на ранних стадиях фиброза. Достоверных различий между концентрациями VEGF при различных стадиях фиброза не было выявлено (p=0,212).

Проведенный корреляционный анализ выявил комплекс взаимосвязей между уровнем TGF-β и другими исследуемыми параметрами. Наибольшая сила корреляционной связи наблюдалась между TGF-β и PDGF-BB (r_{xy}=0.530, p<0.001). Слабая, но статистически значимая прямая корреляция установлена между TGF-β и VEGF (r_{xy}=0.299, p=0.02), в то время как с CTGF значимой взаимосвязи не выявлено.

Выявлены сильные прямые корреляционные зависимости TGF-β с количеством тромбоцитов (r_{xy}=0,598, p<0,001), с концентрацией общего холестерина (r_{xy}=0.516, p<0.001), умеренной силы прямая - с концентрацией триглицеридов (r_{xy}=0.352, p<0.001), отрицательная корреляция умеренной силы с концентрацией прямого билирубина (r_{xy}= 0,452, p<0,001), а также слабой силы прямая корреляционная зависимость с концентрацией альбумина (r_{xy}=0,245, p=0,014).

Для PDGF-BB установлены умеренные прямые корреляции с VEGF (r_{xy}=0.393, p<0.001), АЛТ (r_{xy}=0.359, p<0.001), ГГТ (r_{xy}=0.311, p=0.002), холестерином (r_{xy}=0.431, p<0.001) и тромбоцитами (r_{xy}=0.478, p<0.001), а также слабые прямые корреляции с АСТ (r_{xy}=0.277, p=0.005) и триглицеридами (r_{xy}=0.268, p=0.007). Наиболее сильная прямая корреляция выявлена между PDGF-BB и альбумином (r_{xy}=0.535, p<0.001), тогда как с прямым билирубином установлена слабая обратная связь (r_{xy}=-0.205, p=0.045). Концентрация CTGF слабо коррелировала с альбумином (r_{xy}=0.203, p=0.043) и щелочной фосфатазой (r_{xy}=0.216, p=0.031). Обратные слабой силы корреляции выявлены между CTGF и прямым билирубином (r_{xy}=-0.218, p=0.029) и умеренной силы (r_{xy}=-0.353, p<0.001) с непрямым билирубином.

Слабая прямая корреляционная связь обнаружена между VEGF и церулоплазмином (r_{xy}=0.255, p=0.010), однако с непрямыми маркерами фиброза достоверных взаимосвязей не определено. Связи между TGF-β, PDGF-BB, CTGF и концентрацией церулоплазмина не было обнаружено, установлены слабые прямые корреляции TGF-β (r_{xy}=0.278, p=0.006), PDGF-BB (r_{xy}=0.223, p=0.028) и VEGF (r_{xy}=0.265, p=0.009) с концентрацией меди в суточной моче.

Динамика маркеров фиброзирования на фоне терапии при БВК

Группа 1 (n=9) – первая точка до значения терапии, вторая- через 12 месяцев после назначения купренила;

Группа 2 (n=7) – первая точка в период неэффективности терапии Д-пеницилламином, оцениваемой по суточной экскреции меди с мочой, вторая - через 12 месяцев после коррекции дозы купренила.

В группе 1 было установлено значимое снижение уровня фибротических изменений у 88,8% пациентов (p=0,011), медианы фиброза в двух точках составили 9 [6,1;17,4] кПа и 6,2 [4,5;6,7] кПа, АЛТ у 88,8% детей (p=0,021), медианы – 94 [65,5;231] Ед/л и 39 [24,5;72] Ед/л, АСТ у 88,8% пациентов (p=0,015), медианы – 88 [57,5;105] Ед/л и 26 [22,5;48] Ед/л, ГГТ у 77,7% больных (p=0,038), медины 47 [38;89] Ед/л и 32 [20;46] Ед/л, TGF-β у 66,6% детей (p=0,036), медианы – 57162 [34223;71779] пг/мл и 45684 [31984;58430] пг/мл, а также повышение концентрации CTGF с 22,6 [2,3;30,7] нг/мл до 49,1 [18,1;78,5] нг/мл, отмечавшееся у 88,8% детей (p=0,038). Изменения уровней PDGF-BB и VEGF были статистически незначимы. В группе 2 ни для одного из исследуемых параметров не было выявлено статистически значимых изменений.

ВЫВОДЫ

1. Определено, что болезнь Вильсона-Коновалова манифестирует у детей в возрасте 6,6 [4,6;10] лет и протекает преимущественно (88,5%) с изолированным поражением печени, проявляющимся цитолизом, холестазом и гепатомегалией. Цирроз печени и неврологические симптомы выявляются у детей старше 10 лет (15,6 [12,9;16,5] лет и 12,9 [10,3;16,4] соответственно) и являются следствием естественного течения заболевания. Шансы поражения нервной системы выше в 21,1 раза у больных с циррозом печени (95% ДИ: 4,75-93,8) по сравнению с пациентами, у которых цирроз печени отсутствует.
2. У большинства больных (54%) уровень церулоплазмина находится в диапазоне 11-20 мг/дл (пороговое значение - 16,9 мг/дл, AUC 0,890 [0,846; 0,934], (p<0,001). Параметр не зависит от возраста детей (p =0,965) или формы заболевания (p = 0,966), что позволяет рассматривать его в качестве наиболее надежного маркера для отбора пациентов для диагностики болезни Вильсона-Коновалова, в том числе молекулярно-генетической.
3. Суточная экскреция меди с мочой имеет более низкие значения у детей с БВК в возрасте 5 лет в сравнении с пациентами старше 15 лет (54 [35,8; 68,8] мкг/сут и 194 [86,1; 345,0] мкг/сут соответственно, p=0,002), и у пациентов с абдоминальной формой в сравнении со смешанной формой заболевания (89,3 [54,5; 131,0] мкг/сут и 321,5 [199,0; 521,5] мкг/сут соответственно (p < 0,001). Выявленная корреляция экскреции меди в пробе с Д-пеницилламином с возрастом (r_{xy}= 0,287, p = 0,047) и уровнем нативной меди в моче (r_{xy}= 0,342, p = 0,011), а также установленное пороговое значение 557 мкг/сут (AUC = 0,711 [0,577; 0,846], p = 0,023) свидетельствуют о необходимости учета возрастных факторов при интерпретации результатов пробы у детей.
4. Установлено, что без проведения молекулярно-генетического исследования Лейпцигская шкала и модифицированная шкала Nagral A., 2019 обладают низкой чувствительностью (41,3% и 46,1 %

соответственно), но могут быть использованы для первичного отбора пациентов для проведения молекулярно-генетического исследования. Лейпцигский алгоритм информативен у пациентов младшего школьного возраста (41%) и старше 15 лет (53%), что связано с расширением спектра клинических симптомов, а шкала Nagral A. – у пациентов до 5 лет, за счет измененной балльной градации церулоплазмина и критерия «семейный анамнез».

5. У российских пациентов детского возраста определён широкий спектр генетических вариантов гена *ATP7B*, включающий 51 вариант, из которых 14 ранее не описаны. Наиболее распространёнными вариантами являются *c.3207C>A* – 45,5% всех аллелей, и *c.3402del*, *c.3190G>A*, *c.2304insC*, *c.3036dup*, относительные аллельные частоты которых составляют 6,5%, 6%, 5,5% и 5% соответственно. В структуре выявленных вариантов преобладали миссенс-мутации (67%), реже встречались делеции и вставки со сдвигом рамки считывания (20,5%), а также мутации, приводящие к нарушению сайта сплайсинга (7,2%).

6. Установлено, что расчетная выявляемость болезни Вильсона-Коновалова при помощи молекулярно-генетического исследования экзонов 8, 13-16 гена *ATP7B* с прилегающими интронными областями методом секвенирования по Сэнгеру на первом диагностическом этапе у обследованных российских детей составила 67% и превосходит расчетную выявляемость (39%) исследования 12 частых мутаций гена *ATP7B* методом полимеразной цепной реакции, тогда как высокопроизводительное секвенирование всех кодирующих и прилегающих интронных областей гена *ATP7B* обеспечивает расчетную выявляемость 99%.

7. Анализ генотип-фенотипических взаимосвязей показал, что пациенты, имеющие в генотипе на одном или двух аллелях варианты, приводящие к преждевременной терминации трансляции, имели достоверно более ранний возраст манифестации (5,6 [4,0;10,0] лет против 8 [5,5;10,3] лет, $p= 0,035$) и более низкий уровень церулоплазмина (8,3 [2,6;13,0] мг/дл против 14,0 [10,8;17,0] мг/дл, $p < 0,001$).

8. Установлено, что уровни TGF-β, PDGF-BB и CTGF в сыворотке крови детей с болезнью Вильсона–Коновалова значимо выше при ранних стадиях фиброза (F0–F2) и снижаются при циррозе печени (F4), а концентрация VEGF не зависит от стадии фиброза ($p=0,212$). TGF-β может быть использован как динамический маркер эффективности терапии ($p=0,036$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Детей со стойким необъяснимым цитолизом, холестазом и гепатомегалией следует обследовать для исключения болезни Вильсона-Коновалова, даже при отсутствии других специфических клинических симптомов.

2. В качестве первоначального скринингового метода у пациентов с подозрением на болезнь Вильсона-Коновалова, а также для обследования сибсов пробанда на догенетическом этапе рекомендуется определение церулоплазмина.

3. Детей раннего возраста со сниженным уровнем церулоплазмина и с нормальным или незначительно повышенным уровнем суточной экскреции меди с мочой рекомендовано направлять на молекулярно-генетическое исследование с целью исключения или подтверждения болезни Вильсона–Коновалова.

4. Для оптимизации диагностического процесса при болезни Вильсона-Коновалова рекомендуется использовать клинические шкалы в качестве инструмента первичного скрининга с последующим обязательным молекулярно-генетическим подтверждением. Стратификация по возрасту повышает

эффективность отбора пациентов: у детей до 5 лет целесообразно применять шкалу Nagral A., 2019, тогда как у пациентов старше 15 лет - Лейпцигскую шкалу.

5. На первом этапе молекулярно-генетической диагностики рекомендуется выполнять поиск мутаций в экзонах 8, 13-16 гена *ATP7B* методом секвенирования по Сэнгеру, с последующим использованием метода высокопроизводительного секвенирования для анализа всех кодирующих и прилегающих интронных областей гена *ATP7B* в случае отрицательного результата. Использование ПЦР-панелей с определенным набором частых патогенных вариантов целесообразно в качестве теста первого уровня лишь в отдельных регионах с известной высокой популяционной частотой этих вариантов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Комарова А.Д., Потапов А.С., Савостьянов К.В., Пушков А.А., Мовсисян Г.Б., Усольцева О.В., Фисенко А.П. Сложности диагностики болезни Вильсона у детей раннего возраста. Вопросы детской диетологии. 2024; 22(2): 13–21.

2. Комарова А.Д., Воробьева Н.Л., Джуртубаева Д.Р., Потапов А.С., Савостьянов К.В. Внутрисемейная фенотипическая вариабельность болезни Вильсона–Коновалова у пациентов детского возраста. Неврологический журнал имени Л.О. Бадаляна. 2024;5(4):184-191.

3. Комарова А.Д., Потапов А.С., Курбатова О.В., Семикина Е.Л., Фисенко А.П. Диагностические шкалы болезни Вильсона– Коновалова у детей: ограничения и пути оптимизации. Вопросы детской диетологии. 2025; 23(3): 13–23.

4. Комарова А.Д., Курбатова О.В., Мовсисян Г.Б., Жужула А.А., Сновская М.А., Хохлов Г.Н., Потапов А.С., Семикина Е.Л., Вершинина М.Г., Фисенко А.П. Сывороточные маркеры фиброза печени TGF-β, PDGF, CTGF и VEGF при болезни Вильсона – Коновалова у детей. Кремлевская медицина. Клинический вестник. 2025; 3: 5–11.

5. Комарова А.Д., Савостьянов К.В., Потапов А.С., Пушков А.А., Демьянов Д.С., Фисенко А.П. Болезнь Вильсона-Коновалова в педиатрической практике: молекулярно-генетические особенности, взаимосвязи генотипа и фенотипа. Медицинская генетика. 2026; 25(2): 33-44.

6. Kurbatova O.V., Petrichuk S.V., Kuptsova D.G., Movsisyan G.B., Radygina T.V., Komarova A.D., Anushenko A.O., Freidlin E.V., Semikina E.L., Potapov A.S., Fisenko A.P. Nuclear transcription factor kb (nf-kb) activity in lymphocyte populations in children with Wilson-Konovalov disease, Medical Immunology. 2023. Т. 25. № 5. С. 1205-1212.

7. Курбатова О.В., Петричук С.В., Купцова Д.Г., Радыгина Т.В., Семикина Е.Л., Потапов А.С., Мовсисян Г.Б., Комарова А.Д., Анушенко А.О., Вершинина М.Г., Фисенко А.П. Возрастные особенности субпопуляционного состава и метаболизма лимфоцитов у детей с болезнью Вильсона–Коновалова, Кремлевская медицина. Клинический вестник. 2023. № 2. С. 5-11.

8. Комарова А.Д. Манифестация болезни Вильсона у детей в раннем возрасте. Российский педиатрический журнал. 2023. Т. 26. № S5. С. 39.

9. Комарова А.Д., Потапов А.С., Мовсисян Г.Б. Первичные признаки манифестации болезни Вильсона-Коновалова у детей. Российский педиатрический журнал. 2023. Т. 26. № S4. С. 43.

10. Комарова А.Д., Толегенова А.М., Куваева М.М. Значение молекулярно-генетического исследования в рамках балльной шкалы диагностики болезни Вильсона у детей. Российский педиатрический журнал. 2023. Т. 26. № S2. С. 47-48.

11. Носенко К.М., Комарова А.Д., Прохоренкова М.О. Дебют смешанной формы болезни Вильсона у мальчика 12 лет. Российский педиатрический журнал. 2023. Т. 23. № S1. С. 36.

12. Курбатова О.В., Мовсисян Г.Б., Демьянов Д.С., Парахина Д.В., Комарова А.Д., Купцова Д.Г., Радыгина Т.В., Фрейдлин Е.В., Петричук С.В. Особенности клеточного иммунитета на разных стадиях фиброза печени у детей. В книге: Наукоемкие лабораторные технологии для клинической медицины. Материалы XXVIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Под редакцией В. В. Долгова. Москва, 2023. С. 99-101.

13. Курбатова О.В., Жужула А.А., Лапин С.В., Сновская М.А., Козлова Д.И., Петричук С.В., Купцова Д.Г., Кузнецова Д.А., Мовсисян Г.Б., Комарова А.Д., Радыгина Т.В., Гуслев А.Б., Холопова И.В., Семикина Е.Л., Макарова С.Г., Потапов А.С., Фисенко А.П. Антинуклеарные антитела у детей с болезнью Вильсона. Аллергология и иммунология в педиатрии. 2024. № 1 (76). С. 48-52.

14. Джуртубаева Д.Р., Воробьева Н.Л., Комарова А.Д., Прохоренкова М.О. Фенотипические особенности болезни Вильсона и её исходы у сибсов. Российский педиатрический журнал. 2024. Т. 27. № S2. С. 21-22.

15. Курбатова О.В., Петричук С.В., Купцова Д.Г., Радыгина Т.В., Козлова Д.И., Хижа В.В., Мовсисян Г.Б., Парахина Д.В., Комарова А.Д., Семикина Е.Л., Потапов А.С., Фисенко А.П. Уровень циркулирующих цитокинов у детей с хроническими заболеваниями печени при разных стадиях фиброза. Российский иммунологический журнал. 2025. Т. 28. № 1. С. 135-144.

16. Комарова А.Д,, Потапов А.С. Глава «Болезнь Вильсона» в учебном пособии по педиатрии под редакцией д.м.н. Д.Ю Овсянникова, 2024г.

17. Komarova A.D, Potapov A. S. Wilson's disease in young children: myth or reality? The 56th European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) Annual Meeting 15-18 May 2024 | Milan, Italy.

18. Komarova A.D, Potapov A. S. Difficulties in interpreting Wilson disease screening tests in children? The 57th European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) Annual Meeting 14-17 May 2025 | Helsinki, Finland.