ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ЗДОРОВЬЯ ДЕТЕЙ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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
1.5.7. Генетика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:
Доктор медицинских наук, профессор,
Потапов Александр Сергеевич
Доктор биологических наук, доцент
Савостьянов Кирилл Викторович

Москва - 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ……4

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ……15

1.1. Определение БВК и эпидемиология……15

1.2. Этиология БВК…….. 17

1.3. Патогенез БВК……...19

1.4. Клинические проявления и классификация БВК ……...23

1.4.1. Клинические проявления……..23

1.4.2. Классификация……..27

1.5. Диагностика БВК……...28

1.5.1. Диагностические балльные шкалы……..29

1.5.2. Молекулярно-генетическая диагностика…….34

1.5.3. Взаимосвязи генотипа и фенотипа у пациентов с БВК……..36

1.6. Механизмы фиброза печени ……37

1.7. Неинвазивная диагностика фиброза печени……39

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ……42

2.1. Дизайн исследования и характеристика пациентов ……42

2.2. Методы исследования……45

2.3. Методы статистической обработки данных……51

Глава 3. ОСОБЕННОСТИ КЛИНИЧЕСКОГО ТЕЧЕНИЯ БВК У ДЕТЕЙ, ИНФОРМАТИВНОСТЬ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ И ШКАЛ……. 52

3.1. Клинико-лабораторная характеристика БВК у детей……52

3.2. Сравнительная оценка диагностической ценности лабораторных и инструментальных методов……56

3.3. Оценка информативности диагностических балльных шкал у детей……63

Клинический пример №1……...68

Глава 4. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕТЕЙ С БВК……71

4.1. Спектр и относительные частоты патогенных вариантов гена *ATP7B* у российских детей с БВК ……...71

4.2. Анализ генотип-фенотипических взаимосвязей у детей с БВК…….....81

Клинический пример №2……...86

Глава 5. СОДЕРЖАНИЕ МАРКЕРОВ ФИБРОЗИРОВАНИЯ В СЫВОРОТКЕ НА РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЯХ ФИБРОЗА ПРИ БВК И ИХ ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ……...88

5.1. Взаимосвязь уровня сывороточных биомаркеров фиброзирования со стадией фиброза печени у детей с БВК …….88

5.2. Динамика маркеров фиброзирования на фоне терапии при БВК…….95

ЗАКЛЮЧЕНИЕ……98

ВЫВОДЫ……118

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ…….....121

СПИСОК СОРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ……122

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ……123

ВВЕДЕНИЕ

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 [25, 63, 120].

По современным эпидемиологическим данным частота БВК в мире составляет от 1 : 30 000 до 1 : 100 000 населения и демонстрирует выраженные этно-географические различия [102, 111]. В Российской Федерации распространенность варьирует от 0,3 до 1,8 на 100 000 населения [144]. 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 [25, 38]. 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 [100, 128].

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 их ограниченный охват вариантов снижает 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 [6]. 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 [107].

Степень разработанности 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 [29,128]. 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 [94].

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 типом мутации и клиническими проявлениями заболевания установлено не было, тогда как в других 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 [38, 76, 120,].

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 [29]. 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 [6, 107].

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 [98,122, 139]. Уровень PDGF-BB в сыворотке крови также снижается по мере прогрессирования фиброза у больных хроническими гепатитами В и С (ХГВ, ХГС), достигая минимальных значений при циррозе [70]. 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.3402delC* 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 детей в Российской Федерации. Определены спектр и относительные частоты вариантов гена *ATP7B* в российской педиатрической когорте пациентов 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 международной 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 таблицами, рисунками и 2 клиническими примерами. Список использованной литературы включает 144 источник: 27 отечественный и 117 зарубежных.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Определение БВК и эпидемиология

Болезнь Вильсона-Коновалова (БВК, OMIM 277900) - моногенное заболевание с аутосомно-рецессивным механизмом наследования, обусловленное мутациями в гене *ATP7B*, 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 с развитием цирроза печени, стойких неврологических расстройств и полиорганной недостаточности [25, 44, 120].

Эпидемиологическая картина БВК отличается выраженной межпопуляционной и географической гетерогенностью. Глобальная распространенность заболевания варьирует от 1:30 000 до 1:100 000 человек. В странах Европы частота БВК составляет 1,2–2,0 на 100 000 населения, в США — около 1:30 000, тогда как в России — 1:166 600 [102]. Генетические исследования, проведённые в разных странах, выявили значительные географические различия в частоте носительства вариантов гена *ATP7B*. Наиболее высокий показатель был зарегистрирован в Гонконге (Китай), где масштабный скрининг подростков и взрослых с 2000 по 2016 год (n=7 336 600) показал частоту носительства 1:793 [81]. В Европе данные более вариабельны: в Англии частота выявления вариантов в гомозиготном состоянии среди новорожденных (1995–2009 гг., n=75000) колебалась от 1:2500 до 1:7026 [41], в Италии (Сардиния, 2013 г., n=1 672 404) уровень составил 1:22 707 [64], а в Польше обследование детей 10–14 лет (2016 г., n=385 000) выявило частоту 1:49 000 [96]. Исследования в Азии также демонстрируют значительный разброс: в Корее (2017 г., n=1090 пациентов) носительство было обнаружено с частотой 1:7561 [40]. В России, согласно официальному реестру редких заболеваний за 2016 год, зарегистрирован 1 пациент с БВК на 167 000 человек. Однако, учитывая частоту носительства патогенного

варианта гена — 1:50, расчетная распространенность заболевания должна быть существенно выше и составлять около 1 случая на 10 000 человек [102].

Создание масштабных международных баз данных позволило детализировать генетические особенности БВК в зависимости от региона, подтвердив кластерное распределение определенных вариантов в популяциях, имеющих как культурно-религиозную изоляцию, где чаще встречаются близкородственные браки и ограничена миграция населения (Сардиния, Йемен, Иран, Иордания, Северная Индия), так и географическую изоляцию (Исландия) [64, 101, 102, 138] (таблица 1).

Таблица 1. Распространенность БВК в разных странах мира [102].

Страна	**Год оценки**	**Распространенность БВК**
США	2006-2011	6.4:100.000
Франция	2013	1.5-1.44:100.000
Великобритания	2013	14.2:100.000
Бразилия	2016	4.1:100.000
Ирландия	2011	9.0:100.000
Италия (Сардиния)	2013	36.6:100.000
Корея	2017	13:100.000
Китай (Гонконг)	2000-2016	1.79:100.000

В Российской Федерации эпидемиологическая ситуация также неоднородна и отражает этнографическое разнообразие регионов. Показатели варьируют от 0.39 до 6.5 на 100 000 населения, так в Приморском крае частота составляет 5.6–6.5:100 000), в Удмуртии - 4:100 000, в Хабаровском крае – 1.5:100 000 [3, 5, 117].

Низкая регистрируемая распространенность БВК вступает в очевидное противоречие с высокими популяционными частотами носительства патогенных вариантов гена *ATP7B*, что может быть объяснено комплексом факторов: неспецифичность клинических проявлений, особенно в педиатрической практике,

а также ограниченная чувствительность стандартных диагностических методов и доступности их применения.

1.2. Этиология БВК

БВК обусловлена мутациями в гене *ATP7B*, локализованном на длинном плече 13 хромосомы (13q14.3) и состоящем из 21 экзона и 20 интронов. Данный ген кодирует медь-транпортирующую АТФазу Р-типа, выполняющую ключевые функции в регуляции гомеостаза меди: транспорт меди в аппарат Гольджи для ее включения в апоцерулоплазмин с последующим поступлением в кровоток, а также экскрецию избытка меди из гепатоцита в желчь. Патогенные варианты гена *ATP7B* детерминируют нарушение этих процессов, что приводит к патологическому накоплению меди в различных органах и тканях.

На сегодняшний день описано более 1000 патогенных вариантов гена *ATP7B,* и их число продолжает увеличиваться. Согласно современным каталогам количество уникальных вариантов составляет 1275, среди них преобладают миссенс-мутации, вызывающие единичные замены аминокислот в последовательности белка, однако также встречаются варианты со сдвигом рамки считывания, вызванные делецией или вставкой нескольких нуклеотидов, нонсенс-мутации, приводящие к вставке стоп-кодона и преждевременной терминации трансляции, мутации в сайте сплайсинга и крупные перестройки, которые приводят к грубой модификации или полной потере транскрипта [32]. В отличие от миссенс-мутаций, при которых может сохраняться остаточная функция белка, большинство других вариантов приводят к полной потере функциональной активности *ATP7B* [72].

Большинство пациентов с БВК являются компаунд-гетерозиготами по мутациям гена *ATP7B,* что в совокупности с большим числом описанных вариантов, может обусловливать недостаточную информативность молекулярно-генетических методов исследования, основанных на поиске мажорных вариантов, обладающих наибольшим значением усредненных частот.

Несмотря на значительное число вариантов, их распределение демонстрирует этническую специфичность. Определение набора частых мутаций для конкретной популяции имеет важное практическое значение, поскольку помогает в разработке экономичных и доступных диагностических генетических панелей, позволяя избежать дорогостоящего секвенирования всего гена.

В европейских и американских популяциях наиболее распространенным является патогенный вариант *c.3207C>A*. Среди славян Центральной и Западной Европы частота этого аллеля составляет 38% [102], в то время как в странах Восточной Европы, граничащих с Российской Федерацией, она достигает наивысших значений: в Польше (72%), Литве (69,2%), Чехии (57%), Беларуси (61%), Латвии (52,2%) [122]. В азиатских популяциях преобладают варианты *c.2333G>A*, *c.2621C>T* и *c.2975C>T* [65, 81]

Также отмечается превалирование отдельных вариантов в определенных странах: в Испании - *c.1934T>G* [87] , в странах Восточной Азии - *c.2975C>T*, с.*2332C>T* - в Китае [80], *c.2871del*, и *c.2332C>T* - в Японии [135], *c.2304insC* - в Гонконге и на Тайване [61, 102]. В Латинской Америке выделяются: *c.3695C>T* - в Колумбии и *c.3402del*- в Бразилии и Венесуэле [104, 127].

В Индии имеется свой уникальный профиль в зависимости от региона страны: *c.3305T>C* и *c.2975C>T* в Северной Индии, *c.813C>A* в Восточной и *c.2303C>T* в Южной Индии [95]. Тогда как для Пакистана и Саудовской Аравии характерны *c.2230T*>C и *c.4196A>G* при полном отсутствии основных европейских и азиатских вариантов [102]. В Европе, помимо известного восточноевропейского *c.3207C>A*, в центральных, восточных и северных регионах встречаются такие варианты, как *c.2299insC*, *c.2128G>A* и *c.2906G>A* [43, 119]. Уникальная мутация *c.-441-427del* преобладает в Сардинии [64].

В отечественных исследованиях, как и в мировых, спектр патогенных вариантов изучен преимущественно у взрослых пациентов. По этим данным наиболее распространенным вариантом является *c.3207C>A,* аллельная частота которого составляет 50-54% [1, 29]. Следующими по частоте являются *c.3190G>A* (2,6-8,6%), *c.3402del* (2,6-6,2%), *c.2304insC* (4,9-5,3%), *c.3036insC* (1,2-2,6%).

Особый интерес представляют варианты *c.3036insC* и *c.3190G>A,* которые, вероятно, являются эндемичными для российских больных, так как ни разу не встречались в исследованиях других стран.

Учитывая этническую гетерогенность нашей страны, спектр и относительные частоты патогенных вариантов также различаются между регионами. В исследовании, проведенном в чувашской популяции, было выявлено 2 ранее не описанных варианта: *c.2152G>C* и *c.3942_3947delinsAGA*, последний встречался с частотой 10,7% [7]. В исследованиях, включавших пациентов из дальневосточного округа с 3% аллельной частотой встречался вариант, характерный для азиатской популяции- *c.2333G>A* [59].

На основании этих исследований были разработаны ПЦР-панели, включающие в самом начале 2 варианта, а затем расширенные до 12. Последняя панель ARMS-ПЦР, созданная с использованием DreamTaq Green PCR Master Mix, включает 14 самых часто встречающихся патогенных вариантов гена *ATP7B* [60].

В отличие от взрослого населения, имеющиеся данные о мутационном спектре гена *ATP7B* у детей основаны на небольших выборках, что не позволяет сформировать целостное представление о распространенности отдельных вариантов и их возможном влиянии на течение заболевания [44,45].

1.3. Патогенез БВК

Медь является важнейшим микроэлементом и биологически активным кофактором в организме человека, оказывающим влияние на множество физиологических процессов, включая митохондриальное дыхание, пути биосинтеза и механизмы антиоксидантной защиты [90].

Будучи жизненно важным кофактором металлоферментов, медь играет ключевую роль во многих физиологических процессах в организме человека: способствует активности ключевых ферментов в дыхательной цепи, тем самым обеспечивая эффективный энергетический обмен; учувствует в синтезе нейромедиаторов и пептидных гормонов, тем самым улучшая нейронную передачу

сигналов и гормональную регуляцию; нейтрализует свободные радикалы, снижая окислительное повреждение клеток [39].

Организм человека в основном получает около 1-2 мг чистой меди в день из пищи и воды. На поверхности эпителиальных клеток тонкого кишечника поступающая с пищей Cu^{2+} под действием редуктаз восстанавливается до Cu^{+} и поглощается внутриклеточно с помощью переносчиков CTR1 и DMT1 [27, 132]

Экскреция меди из энтероцита в кровоток осуществляется с помощью Cu-АТФазы — ATP7A. Не всосавшаяся медь остается в энтероцитах, связанная с металлотионеинами и удаляется через кишечник при десквамации реснитчатого эпителия, предохраняя, таким образом, внутриклеточные структуры от избытка не только ионов меди, но и цинка, и кадмия.

В кровотоке медь соединяется с альбумином, гистидином и макроглобулином и, достигая гепатоцита, транспортируется в клетку с помощью переносчиков CTR1, DMT1, аналогичных переносчикам меди в энтероцитах. В цитоплазме гепатоцита медь транспортируется металлошаперонами к местам синтеза медьсодержащих протеинов: CCS-шаперон транспортирует медь к цитозольной Cu/Zn-зависимой супероксиддисмутазе (SOD1); COX17-металлошаперон переносит медь к митохондриям, где с помощью SCOI/SCOII-протеинов происходит встраивание меди в цитохром с-оксидазу; ATOX1 доставляет медь к ATP7B в аппарат Гольджи [39, 142].

Белок ATP7B, относящийся к семейству мембранных P-тип АТФаз, имеет сложное строение, включающее несколько функциональных доменов: N-домен, обеспечивающий связывание нуклеотидов: P-домена с мотивом фосфорилирования; A-домен, регулирующий дефосфорилирование, а также шесть-восемь трансмембранных спиралей и N-концевой участок, содержащий повторяющиеся медь-связывающие мотивы Cys-X_2-Cys. Благодаря такому строению ATP7B способен динамически изменять локализацию: при низкой внутриклеточной концентрации меди белок находится в аппарате Гольджи, а при её избытке перемещается к каналикулярной мембране для стимуляции экскреции меди в желчь [44].

В норме белок ATP7B обеспечивает два основных направления транспорта меди из гепатоцитов [130]:

1) билиарная экскреция - перенос меди в просвет желчных канальцев для последующей элиминации из организма;

2) биосинтетическая функция - перенос меди в аппарат Гольджи для инкорпорации в церулоплазмин и в медь-зависимые ферменты.

Церулоплазмин – это медьсодержащий α_2-глобулин плазмы крови, синтезируемый в печени и связывающий до 95% меди [76]. Он выполняет не только транспортную функцию, но и обладает феррооксидазной активностью, окисляя ионы Fe2+ до Fe3+ для связывания с трансферрином, а также участвует в нейтрализации свободных радикалов и процессах окисления липидов.

Трансмембранный перенос меди, катализируемый ATP7B, представляет собой строго регулируемый многостадийный процесс. Первоначально происходит координированное связывание субстратов: ионы меди фиксируются N-концевыми металл-связывающими доменами белка, а молекула АТФ – нуклеотид-связывающим доменом. Последующий гидролиз АТФ индуцирует конформационные перестройки белка, сопровождающиеся аутофосфорилированием консервативного остатка Asp1027 в P-домене. Ключевым этапом цикла является дефосфорилирование, в ходе которого высвобождается энергия, необходимая для транслокации ионов меди через липидный слой мембраны [108].

Каждый из этих этапов может быть затронут патогенными вариантами, вызывающими БВК [68]. Эффект может привести как к полной потере функции ATP7B, так и к его частичной инактивации, если патогенные варианты снижают сродство к субстратам, замедляют конформационные переходы или мешают точному нацеливанию белка на комплекс Гольджи или везикулы.

Так, например, при исследования функциональной характеристики мутаций Forbes J. и соавт. выявили, что вариант *p.R778L* приводит как к нарушению включения меди в церулоплазмин, так и к её выведению с желчью. В случае варианта *p.G943S* наблюдается селективное нарушение регуляторной функции

ATP7B: сохраняется каталитическая активность и базальная локализация в комплексе Гольджи, что обеспечивает физиологическое насыщение церулоплазмина, и отсутствует способность к адекватному внутриклеточному перемещению в ответ на повышение концентрации меди. Данный дефект делает невозможным экскрецию избытка меди в желчь, что приводит к ее аккумуляции в гепатоцитах и развитию токсического поражения печени, несмотря на нормальный уровень церулоплазмина в сыворотке крови [57].

Исследование Roy S. и соавт. демонстрирует, что в условиях компаунд-гетерозиготности, характерной для большинства пациентов с БВК, различные мутантные аллели *ATP7B* способны к физическому взаимодействию с образованием гетеродимерных комплексов. Моделирование ко-экспрессии вариантов *p.A595T* и *p.G1061E*, обнаруженных у пациента, выявило феномен частичной функциональной компенсации: *ATP7B-G1061E*, который в гомозиготном состоянии подвергается ретенции в эндоплазматическом ретикулуме, в присутствии *ATP7B-A595T* приобретает способность к корректному таргетированию в транс-аппарат Гольджи. Вместе с тем, сформированный гетеродимер утрачивает ключевую функциональную характеристику, присущую гомодимеру *A595T* — способность к медь-индуцированному траффикингу из аппарата Гольджи. Эти данные служат прямым доказательством того, что аллельные взаимодействия способны модулировать клеточный патофизиологический профиль мутантных белков [108].

Функциональная характеристика патогенных вариантов гена *ATP7B* открывает перспективы не только для углубленного понимания молекулярных основ заболевания, но и для разработки научных подходов определения генотип-фенотипических взаимосвязей.

Нарушение равновесия между кишечной абсорбцией и билиарной экскрецией меди является первичным звеном патогенеза БВК. Изменение функциональной активности ATP7B обуславливает нарушение включения меди в церулоплазмин и ее гепатобилиарную экскрецию, что приводит к накоплению металла в гепатоците и индуцирует образование свободных радикалов, перекисное

оксиление липидов клеточных мембран, денатурацию структурных и ферментативных белков, а также нарушениям метаболизма метионина с последующим гипометилированием ДНК [93]. На субклеточном уровне наблюдается повреждение ключевых органелл - митохондрий, ядерных структур и пероксисом, что инициирует процессы апоптоза и некроза клетки [39, 130].

Поскольку 95% экскреции меди осуществляется через печень, при ее избытке в организме первичное накопление происходит именно в этом органе, что приводит к повреждению печеночной структуры различной степени тяжести. В дальнейшем медь депонируется и в других органах, преимущественно в головном мозге [39, 44, 54].

Попадая в другие органы и ткани, медь оказывает хроническое токсическое действие, универсальными механизмами которого являются провокация окислительного стресса, развитие митохондриальной дисфункции и прямое повреждение клеточных структур. В центральной нервной системе это приводит к повреждению нейронов базальных ганглиев и мозжечка, что клинически проявляется экстрапирамидными расстройствами, атаксией и когнитивным нарушениям. В крови прямое повреждение мембран эритроцитов приводит к их гемолизу и развитию анемии, а в почках — к нарушению функции канальцев и синдрому Фанкони. В тоже время связывание циркулирующей свободной меди в крови с тканевыми белками роговицы не приводит к нарушению структуры и функции органа, но формирует важный диагностический критерий — кольца Кайзера-Флейшера [39].

1.4. Клинические проявления и классификация БВК

1.4.1. Клинические проявления БВК

Клинические проявления БВК отличаются полиморфизмом и могут варьировать от бессимптомного течения до тяжёлых поражений печени и центральной нервной системы, однако у детей, особенно первых 5 лет жизни,

симптоматика не обладает специфичностью по сравнению с поражениями печени другой этиологии и ограничивается изолированным повышением трансаминаз и структурными изменениями паренхимы печени при инструментальном обследовании [50, 128, 141].

Первые симптомы БВК могут появиться в любом возрасте, чаще с 5 до 35 лет, средний возраст у детей составляет 13 лет [38, 44, 49]. Дебют заболевания в раннем детстве встречается крайне редко, что связано с недостаточным накоплением меди в органах-мишенях, однако в литературе описаны случаи цирроза печени у ребенка 3 лет и острой печеночной недостаточности (ОПН) у ребенка 5 лет [113, 129]. Самый поздний возраст диагностики БВК зафиксированный с помощью молекулярно-генетического анализа составляет 72 года [23].

В младших возрастных группах клиническая картина чаще определяется признаками поражения печени, тогда как неврологические и психиатрические проявления становятся более типичными в подростковом возрасте и у взрослых пациентов [38, 55, 56]. Бессимптомные формы встречаются у 5–10% детей, как правило, в ходе обследования родственников по поводу уже выявленного заболевания, и характеризуются лишь биохимическими отклонениями или выявлением вариантов в гене *ATP7B*.

Полиморфизм клинических проявлений БВК, обусловлен вовлечением в патологический процесс нескольких органов и систем: печени, нервной системы, глаз, реже сердца, почек, костей и желез внутренней секреции (таблица 2).

Поражение печени является наиболее частым проявлением у детей, охватывая до 60–70% случаев. Спектр клинических проявлений варьирует от лёгкого стеатоза и бессимптомного повышения трансаминаз до хронического гепатита, цирроза и острой печёночной недостаточности [130]. Наиболее часто встречаются гепатоспленомегалия, желтуха, абдоминальные боли, асцит, признаки портальной гипертензии, сосудистые «звёздочки» и кровотечения из верхних отделов желудочно-кишечного тракта [38, 50].

Таблица 2. Спектр и частота клинических проявлений БВК у детей [38].

Проявления БВК	Симптомы	Частота у детей
Печеночные	НАЖБП/НАСГ Острый гепатит/ОПН Хронический гепатит (в т.ч. изолированный цитолиз) Хроническая печеночная недостаточность/цирроз печени	60-70% (ОПН 3-5%) [25]
Неврологические и психиатрические	Дизартрия, слюнотечение Атаксия Паркинсонизм Эмоциональная лабильность Депрессия Резкие изменения личности Тремор Дистония Хорея, атетоз Судороги Деменция и когнитивные нарушения Вегетативная дисфункция	До 20%
Офтальмологические	Кольца Кайзера—Флейшера Катаракта по типу «подсолнуха»	<5%
Гематологические	Кумбс-негативная гемолитическая анемия	7%
Почечные	Дисфункция почечных канальцев Нефролитиаз Нефрокальциноз	-*
Кардиологические	Кардиомиопатия Сердечная недостаточность Аритмия	-*
Скелетные	Рахит/остеопения/остеопороз Артропатия	-*
Эндокринологические	Гипопаратиреоз Аменорея и бесплодие	-*
Кожные	Липомы, гиперпигментация	-*
Другие	Панкреатит Холелитиаз	-*
Примечание: *- статистические данные о частоте выявления у детей отсутствуют.		

Особое место занимает острая печёночная недостаточность, которая чаще наблюдается у девочек и характеризуется сочетанием выраженной

гипербилирубинемии, низкого уровня щелочной фосфатазы при соотношении ЩФ/билирубин менее 4, резистентной коагулопатии, энцефалопатии и почечной недостаточности и ассоциируется с неиммунным (Кумбс-отрицательным) внутрисосудистым гемолизом [113, 130]. У некоторых пациентов наблюдаются преходящие эпизоды желтухи из-за гемолиза, без видимой печеночной недостаточности или клинически выраженного заболевания печени. В отдельных случаях печёночные проявления могут имитировать неалкогольную жировую болезнь печени, аутоиммунный или вирусный гепатит, что осложняет диагностику, а наличие скрытых форм с изолированными биохимическими изменениями требует проведения целенаправленного молекулярно-генетического поиска.

Неврологическая симптоматика в педиатрической когорте пациентов встречается значительно реже, чем у взрослых: она составляет лишь 5-15% случаев и возникает преимущественно у подростков, тогда как у взрослых пациентов доходит до 18–68% [38, 44]. Клинические проявления включают дизартрию, дистонию, изменения походки, атаксию, тремор, паркинсонизм и хорею [130]. Психиатрические проявления могут предшествовать соматическим признакам. У пациентов младшего школьного возраста они проявляются снижением концентрации внимания, нарушениями памяти, падением школьной успеваемости, трудностями в обучении, эмоциональной лабильностью и агрессивностью. В подростковом возрасте психические нарушения нередко ошибочно интерпретируются как особенности поведения или следствие употребления психоактивных веществ [51, 56, 105].

Офтальмологические изменения включают кольца Кайзера-Флейшера и катаракту в виде подсолнуха. Оба эти изменения обратимы при медикаментозной терапии или после трансплантации печени. Следует отметить, что данные симптомы, хотя и специфичны для БВК, они редко встречаются у детей, особенно в раннем детстве, и чаще обнаруживаются у подростков и молодых взрослых с более тяжёлым заболеванием печени и/или неврологическими симптомами [25, 105, 120, 130].

Характерным гематологическим признаком БВК является Кумбс-негативный гемолиз, встречающийся у 4-10% детей [116]. Он может быть как изолированным проявлением заболевания, так и сочетаться с острой печёночной недостаточностью, что значительно утяжеляет клиническое течение [38, 116].

К числу редких, но клинически значимых проявлений болезни у детей относятся почечные нарушения, эндокринные и скелетные изменения [93]. Среди них описаны тубулопатии по типу синдрома Фанкони, аминокислурия, нефролитиаз, а также остеопения и остеопороз. Эндокринные расстройства включают задержку полового развития, нарушения менструального цикла и снижение фертильности. Редко встречаются кардиомиопатии, аритмии и панкреатиты. Частота этих проявлений не превышает 5–10%, однако они существенно усложняют клиническую картину и требуют междисциплинарного подхода [25, 50, 120].

Неспецифичность и полиморфизм клинических проявлений, зависимость степени их выраженности от возраста пациента не позволяют надежно дифференцировать БВК от гепатитов другой этиологии, что существенно затрудняет своевременную диагностику и приводит к прогрессированию заболевания с формированием необратимых и жизнеугрожающих состояний.

Согласно данным литературы, наблюдается гендерная зависимость в клинической манифестации БВК: для пациентов женского пола в большей степени характерны печеночные проявления, в то время как у пациентов мужского пола чаще доминирует неврологическая симптоматика [25, 55]. Кроме того, женщины имеют более высокий риск развития фульминантной печеночной недостаточности [44, 55, 116].

1.4.2. Классификация БВК

Клиническая картина БВК характеризуется разнообразием как неврологических, так и соматических проявлений. Это нашло свое отражение в различных классификациях заболевания. В настоящее время чаще всего

используется классификация БВК, в основе которой лежит клинико-патоморфологический принцип. Выделяют следующие формы БВК:

- Бессимптомная форма: клинических проявлений нет, диагноз установлен до проявления симптомов.
- Абдоминальная (печеночная) форма
- Церебральная (неврологическая) форма
- Смешанная форма: сочетание неврологических и печеночных проявлений.

Согласно критериям международной исследовательской группы по БВК фенотипы подразделены на следующие [52]:

- H1 – острая печеночная недостаточность (острая желтуха у ранее условно здорового человека, вызванная заболеванием похожим на гепатит, протекающая с или без гемолитической Кумбс-негативной анемии).
- H2 – хронический гепатит, протекающий как бессимптомно, так и с признаками печеночной недостаточности.
- N1 – неврологическая симптоматика у пациентов с циррозом печени.
- N2 – неврологическая симптоматика у пациентов с отсутствием выраженного поражения печени (допустим фиброз/стеатоз печени)

1.5. Диагностика БВК

Диагностика БВК основывается на комплексе клинических симптомов, данных лабораторно-инструментального обследования и результатов молекулярно-генетического тестирования.

Доминирующим клинико-лабораторным фенотипом БВК у детей выступает изолированное повышение аминотрансфераз в сочетании с ультразвуковыми признаками структурных изменений паренхимы и гепатомегалии. Данный вариант манифестации создаёт существенные диагностические сложности, обусловленные

необходимостью проведения дифференциальной диагностики с широким спектром врождённых и приобретённых заболеваний печени.

1.5.1. Диагностические балльные шкалы

В 2001 г. на VIII международной конференции, посвященной изучению болезни Вильсона и болезни Менкеса была принята балльная система диагностики БВК (таблица 3).

Таблица 3. Балльная система диагностики БВК, Лейпциг 2001г. [143]

I. Симптомы	**Баллы**	**II. Лабораторные тесты**	**Баллы**
1.Кольца Кайзера-Флейшера		1. **Экскреция меди с мочой**	
- присутствуют	**2**	- -норма	**0**
- отсутствуют	**0**	- 50-100 мкг/сут	**1**
		- более 100 мкг/сут	**2**
		- норма, но увеличение более 5 норм при пробе 2х0,5 г пеницилламином	**2**
2.**Нейропсихиатрическая симптоматика (или типичные изменения на МРТ мозга)**		2. **Количественное определение меди в биоптатах печени**	
		- норма	**-1**
		- 50-250 мкг/г	**1**
- выраженные	**2**	- более 250 мкг/г	**2**
- умеренные	**1**		
- отсутствуют	**0**		
3.**Кумбс-негативная гемолитическая анемия**		3. **Родамин – позитивные гепатоциты (при невозможности количественного определения меди в печени)**	
- присутствует	**1**		
- отсутствует	**0**	- присутствуют	**1**
		- отсутствуют	**0**
III. Молекулярно - генетическое исследование (выявление мутаций гена *ATP7B*)		4. **Уровень церулоплазмина в сыворотке крови (при норме более 20 мг/дл)**	
		- норма	**0**
- гомозигота (компаунд-гетерозигота)	**4**	- 10-20	**1**
		- менее 10	**2**
- гетерозигота	**1**		
- мутаций не обнаружено	**0**		
Примечание: сумма баллов ≤2- БВК сомнительна, 3 балла-БВК вероятна, но требуется дальнейшее обследование, 4 и более- диагноз БВК установлен.			

Своевременная диагностика БВК крайне важна, поскольку она влияет да прогноз и исходы заболевания. Пациенты с циррозом печени, неврологическими проявлениями и кольцами Кайзера-Флейшера диагностируются относительно легко, поскольку у них наблюдаются явные клинические признаки и симптомы [35, 105, 120]. Однако примерно у половины пациентов детского возраста с заболеваниями печени отсутствуют два из этих трёх критериев, а уровни церулоплазмина и суточной экскреции меди с мочой могут находиться в пределах референсных значений, что существенно снижает информативность стандартного диагностического алгоритма в данной возрастной группе.

Церулоплазмин является первым скрининговым тестом, проводящимся для диагностики БВК. Следует отметить, что низкая концентрация церулоплазмина может также наблюдаться при других состояниях, таких как недоедание, энтеропатия с потерей белка, цирроз печени с нарушением белково-синтетической функции, у здоровых новорожденных, болезнь Менкеса, нефротический синдром, наследственная ацерулоплазминемия и приобретенные состояния дефицита меди, а также находиться у гетерозиготных носителей гена *ATP7B* [44]. Помимо этого, уровень церулоплазмина в крови напрямую зависит от метода его определения. Стандартные иммунологические анализы могут показывать ложноотрицательный результат, так как измеряют общее количество белка, включая его неактивную форму [89].

Зарубежные и отечественные рекомендации по БВК предлагают пороговый уровень (<20 мг/дл). Он может быть использован у бессимптомных детей с изолированным цитолизом, однако в нескольких исследованиях для пациентов с нарушением функции печени и/или неврологическими проявлениями был предложен уровень <14 мг/дл [85, 100, 109, 133].

У пациентов с БВК общее содержание меди в сыворотке обычно снижено, но уровень свободной, не связанной с церулоплазмином меди, наоборот, значительно повышен. Её концентрацию рассчитывают по формуле, вычитая из общего уровня меди количество, связанное с церулоплазмином [2, 38]. Однако этот метод имеет недостатки, так как зависит от точности исходных измерений. Более современным

и точным методом является измерение обменной меди, которая напрямую отражает уровень токсичной свободной меди. Несмотря на высокую диагностическую ценность, этот тест малодоступен из-за высокой стоимости и используется в основном в научных целях.

Поскольку избыток меди выводится с мочой, определение содержания меди в моче использовалось в качестве одного из методов для диагностики БВК, однако его точность зависит от соблюдения стандартизированных условий преаналитического этапа, включая продолжительность сбора мочи, материал контейнеров и квалификацию персонала.

Согласно педиатрическим исследованиям, экскреция меди более 100 мкг/сутки обладает высокой специфичностью и низкой чувствительностью, в то время как снижение порогового уровня сопровождается повышением чувствительности без значимого снижения специфичности [109]. Следует учитывать, что на ранних стадиях заболевания, особенно при бессимптомном течении или минимальной печеночной симптоматике, у 16–23% пациентов экскреция меди может оставаться в пределах референсных значений, а у пациентов с аутоиммунным гепатитом, хроническим холестатическим заболеванием печени и острой печеночной недостаточностью любой этиологии, возможно ее повышение [44, 50, 63]. По данным ряда исследования уровень суточной экскреции меди с мочой зависит от возраста пациента на момент диагностики [46, 100]. Хотя метод и обладает высокой диагностической точностью, зависимость параметра от возраста может быть основополагающим фактором в получении ложноотрицательных результатов у детей с БВК.

Провокационный тест с Д-пеницилламином, измеряющий экскрецию меди с мочой, может служить дополнительным диагностическим инструментом. Несмотря на стандартизацию для детей (двукратный прием 500 мг препарата с 12-часовым интервалом), его диагностическая ценность ограничена. Хотя уровень экскреции >1600 мкг/24 ч (>25 мкмоль/24 ч) достаточно надежно отличает БВК от других патологий печени, его чувствительность у бессимптомных пациентов низка [105]. Использование более низкого порогового значения (пятикратное повышение

от нормы), предложенное в шкале, обладает более высокими значениями чувствительности, но низкими значениями специфичности [92, 100].

Проведение биопсии печени рекомендуется при подозрении на другую или сочетанную патологию печени, или если клинические признаки и другие неинвазивные тесты не позволяют поставить точный диагноз [43]. Измерение концентрации меди в печеночной паренхиме имеет важное значение, поскольку диагностическая ценность только гистологического исследования ткани печени или отложения меди, выявленного с помощью окрашивания роданином или орсеином, ограничена.

Морфологическая картина БВК неспецифична и включает стеатоз, цитоплазматические включения неправильной формы, отложение меди, гликогенсодержащие вакуоли в ядрах, отложение липофусцина и железа (у пациентов с гемолизом), а также портальный фиброз и воспаление, подобное аутоиммунному гепатиту [56, 120]. Положительное окрашивание может наблюдаться при многих холестатических заболеваниях печени, при этом отрицательное не исключает БВК [38, 63, 116].

Концентрация меди в печени >250 мкг/г сухой массы печени принята в качестве порогового значения для БВК, учитывая её чувствительность 65,7–94,4% и специфичность 52,2–98,6%, однако несмотря на высокую информативность, существует риск получения ложноотрицательных результатов, что может быть связано с бессимптомным течением или неврологической формой, а также с неоднородным распределением меди в печени и малыми размерами исследуемого биоптата [89, 109, 136].

Кольца Кайзера-Флейшера, являющиеся специфическим признаком БВК, присутствуют в 90-100% случаев у взрослых пациентов с неврологической формой, и могут быть обнаружены в 40-60% случаев при печеночной форме БВК [44, 50]. Сходные корнеальные изменения могут наблюдаться при первичном билиарном циррозе, аутоиммунном гепатите и тяжелом холестазе, однако в отличие от БВК их патогенез связан не с кумуляцией меди, а с отложением билирубинового пигмента на фоне гипербилирубинемии [44].

Диагностическая Лейпцигская балльная система БВК валидирована как у взрослых, так и у детей; чувствительность и специфичность, основанные на исследовании Koppiker S., составили 98,1% и 96,5% соответственно [78]. Обнаружение патогенных вариантов в гене *ATP7B* играет важную роль в верификации диагноза, особенно при отсутствии типичных симптомов, так как выявление биаллельных вариантов соответствует 4 баллам и окончательно подтверждает диагноз. Согласно исследованию Балашовой М.С., у четверти (24,12%) взрослых пациентов с БВК при использовании Лейпцигского алгоритма диагностики без учета молекулярно-генетического тестирования диагноз был маловероятным, что преимущественно было обусловлено отсутствием колец Кайзера-Флейшера и незначительным снижением уровня церулоплазмина [29]. В педиатрическом исследовании Четкиной Т.С. только у 16 (15,8%) из 101 детей диагноз был вероятен, у 85 (84,2%) был установлен [21]. По данным Wiernicka A. и соавт. применение данной балльной системы без учета результатов молекулярно-генетического исследования детей раннего возраста (до 5 лет) позволило установить диагноз лишь у 8/21 (38,1%) пациентов [128].

Доступность некоторых базовых методов диагностики (определение меди в ткани печени и генетическое тестирование) в ряде стран с низким экономическим развитием все еще ограничена, что побуждает исследователей модернизировать шкалы с учетом социально-экономических возможностей страны [63]. Так в Индии в 2019 г. Nagral A. и соавт. была предложена измененная Лейпцигская шкала диагностики, в которой скорректирована балльная градация церулоплазмина, добавлен критерий «семейный анамнез» и исключены количественная оценка содержания меди в печени и проба с Д-пеницилламином [94].

Диагностические шкалы играют важную роль в верификации БВК, однако их информативность зависит от множества факторов, включая чувствительность и специфичность используемых критериев, доступность лабораторных и инструментальных методов, а также индивидуальные особенности пациента. В связи с этим актуальным остается вопрос оптимизации диагностических

протоколов, позволяющих минимизировать количество ложноположительных и ложноотрицательных результатов у детей.

1.5.2. Молекулярно-генетические методы диагностики

Молекулярно-генетическое тестирование приобретает первостепенное значение в диагностике БВК, поскольку оно обеспечивает точную дифференциацию между здоровыми гетерозиготными носителями и пациентами с бессимптомной формой заболевания, а также может служить единственным методом, позволяющим установить БВК без проведения дополнительного обследования [56].

Для решения указанной задачи в нашей стране традиционно используется метод ПЦР, направленный на поиск частых мутаций в конкретном гене. При этом диагностическая ценность исследования ограничена его избирательностью, поскольку анализу подвергается лишь определенный набор патогенных вариантов гена. Тест обеспечивает идентификацию патологического аллеля с эффективностью 45 - 60% от общего их числа [29].

Традиционным и высокоинформативным методом для выявления патогенных вариантов, включая изменения в кодирующих и некодирующих областях (за исключением протяженных делеций, инсерций и перестроек) является секвенирование по Сэнгеру [50, 120]. Хотя метод обладает большей разрешающей способностью и точностью, относительно метода ПЦР в режиме реального времени, его широкое использование ограничено высокой стоимостью ввиду значительной протяженности гена *ATP7B*. Развитие технологии высокопроизводительного секвенирования (ВПС) и его внедрение в клиническую практику позволило преодолеть эти ограничения, повысив скорость и информативность генетической диагностики [4]. Несмотря на несомненные преимущества, метод ВПС характеризуется рядом методических ограничений. К их числу относится неспособность надежной детекции протяженных делеций,

дупликаций и инверсий, а также случаев мозаицизма при стандартном покрытии таргетных областей.

Хотя патогенные варианты могут быть идентифицированы с помощью ВПС у 95-100% пациентов [13, 29], данный вид генетического тестирования все еще не является широкодоступным из-за своей стоимости. Кроме того, если у пациента идентифицирован только один патогенный вариант, ребенок является либо гетерозиготным носителем, либо пациентом с БВК, у которого второй гетерозиготный вариант еще не обнаружен, что требует проведения дальнейшего генетического анализа, зачастую при помощи метода мультиплексной лигирующей амплификации зондов для поиска крупных дефектов генов, таких как протяженные делеции или дупликации, которые очень сложно идентифицировать с помощью прямого секвенирования по Сэнгеру [48, 114, 116].

Так по результатам Mukherjee S. и соавт., после проведенного скрининга 20 экзонов *ATP7B* (2–21) и фланкирующих областей из образцов геномной ДНК методом секвенирования по Сэнгеру у 31% пациентов был идентифицирован только 1 вариант, а у 11% – ни одного. При проведении MLPA (промоторы 5′UTR, экзон 1 (1832bp) и 3′UTR (2478bp) в данных группах пациентов удалось обнаружить 18 аллелей и подтвердить диагноз у 12 больных [91].

Исходя из этого, требуется определение наиболее экономически целесообразного и информативного подхода к генетической диагностике, который должен обеспечить высокую диагностическую точность за счет рационального, поэтапного использования существующих технологий — от доступных скрининговых методов до высокопроизводительного секвенирования. Оптимизированный диагностический алгоритм позволит не только минимизировать финансовые затраты пациента, но и сократить время до постановки окончательного диагноза, что является ключевым условием для своевременного начала терапии и улучшения прогноза у пациентов с БВК.

1.5.3. Генотип-фенотипические взаимосвязи при БВК

Применение молекулярно-генетического тестирования позволило не только сократить время диагностики, но и открыло перспективы для изучения взаимосвязи генотипа и фенотипа БВК. Исследования, проведенные ранее в этой области при других моногенных заболеваниях, определили взаимосвязь между генотипом, тяжестью и спектром клинических проявлений заболеваний. Одними из них являются муковисцидоз, спинальная мышечная атрофия и фенилкетонурия [24, 74, 88]. Среди заболеваний печени, в том числе болезней накопления, выявлены взаимосвязи между генотипом и формами заболевания, например для болезни Гоше и болезни Ниманна-Пика [19, 71].

Определение генотип-фенотипических корреляций для БВК является сложной задачей, что связано с числом патогенных вариантов, превалированием пациентов с компаунд-гетерозиготным состоянием, а также с гипотетическим влиянием эпигенетических и средовых факторов.

Результаты немногочисленных исследований, посвященных изучению фенотипических особенностей БВК у членов одной семьи, имеющих не только одинаковый генотип, но и находящихся под воздействием сходных средовых факторов, значимо разнятся [28, 43, 68, 119, 124]. Данные Chabik G. и соавт. свидетельствуют о высоком уровне внутрисемейной конкордантности между сиблингами с печеночной (86%) и неврологической (66%) формой БВК [37]. В то же время Yahata S. и соавт. утверждают, что фенотипические комбинации у сиблингов в основном модифицированы внешне индуцированными гемолитическими эпизодами, а хроническое поражение органов разделялось по формированию неврологических осложнений, связанных с возрастом [134].

По результатам исследования Ferenci P. и соавт. наиболее значимым влиянием на формирование фенотипа БВК обладают пол и возраст пациентов. По их данным на момент постановки диагноза уже у 39,5% детей/подростков был цирроз печени, наличие которого не коррелировало с генотипом. Также определено, что неврологическая симптоматика чаще развивалась у лиц мужского пола, в то время

как у женщин превалировало изолированное поражение печени [53, 55]. В тоже время предположение, что возраст играет наиболее важную роль в формировании фенотипической вариабельности БВК, опровергается клиническими наблюдениями, описывающими различное течение заболевания у монозиготных близнецов [110, 112].

По результатам отдельных европейских исследований была выявлена связь варианты *c.3207C>A* с более поздней манифестацией БВК, легким поражением печени, а также развитием неврологических симптомов [53, 59, 67], в то время как в других похожих исследованиях данных корреляций не было обнаружено [119, 124]. У пациентов с ОПН с гемолитической анемией варианты *c.2817G>T* и *c.2530A>T* встречались чаще, чем при других менее тяжёлых формах, при которых чаще встречался вариант *c.3207A>G*. В некоторых исследованиях сообщалось о взаимосвязи мутации *c.3884C>T* с развитием абдоминальной формы заболевания, а *c.2333G>T* - с неврологической формой БВК [81, 131].

Также некоторые современные исследования демонстрируют определенные закономерности: БВК у пациентов с нонсенс-мутациями или мутациями со сдвигом рамки считывания характеризуются ранней манифестацией, тяжелым поражением печени с формированием цирроза, а также более низкими значениями церулоплазмина и высоким уровнем меди в моче [29, 43, 68]. Большинство исследований в данной области проводились среди взрослых пациентов или в смешанных возрастных группах, что существенно ограничивает возможность экстраполяции полученных результатов на детское население.

Изучение генотип-фенотипических взаимосвязей у детей с БВК может способствовать углублению понимания особенностей течения заболевания в этой возрастной группе, а также оптимизировать подходы к диагностике и мониторингу болезни.

1.6. Механизмы фиброзирования печени

Прогрессирующее течение фиброза печени ведет к развитию цирротических изменений органа, что, по данным статистики, ежегодно служит причиной более

1,4 млн летальных исходов в мире [6]. На сегодняшний день единственным способом затормозить темпы прогрессирования заболевания остается элиминация этиологического фактора, повреждающего орган [7].

Наиболее важным клеточным элементом в процессе образования внеклеточного матрикса является миофибробласт. В фиброгенные миофибробласты могут трансформироваться разные клетки, в том числе портальные миофибробласты и мезенхимальные стволовые клетки костного мозга. Преобладающими клетками печени, вырабатывающими микросомальные ферменты, являются покоящиеся звёздчатые клетки печени, также известные как клетки Ито или перисинусоидальные клетки, которые находятся в пространстве Диссе [33].

Гепатоциты могут реагировать на такое повреждение различными способами, включая выработку активных форм кислорода и апоптоз, в то время как резидентные макрофаги печени, называемые клетками Купфера, вызывают мощный иммунный ответ, приводящий к привлечению других воспалительных клеток в место повреждения [86].

Привлечённые хемокинами, лейкоциты выходят из кровеносных сосудов в область повреждения и способствуют высвобождению дополнительных провоспалительных и профибротических медиаторов, активных форм кислорода, азота, протеаз и липидных метаболитов, такие как простагландины и тромбоксан [58]. В результате этой реакции покоящиеся гемопоэтические стволовые клетки превращаются в активированные миофибробласты и начинают экспрессировать рецептор тромбоцитарного фактора роста (PDGF) и рецептор трансформирующего фактора роста (TGF) [75]. TGF-β, являющийся основным молекулярным медиатором фиброгенеза, ингибирует апоптоз клеток Ито и активирует их рецептор 1 типа, который далее фосфорилирует внутриклеточные белки SMAD. PDGF, образующийся в ответ на повреждение печени, проявляет митогенную активность стимулирует пролиферацию гемопоэтических стволовых клеток [30]. Помимо этого, в процессе фиброзирования учувствуют фактор роста соединительной ткани (CTGF) – медиатор, усиливающий продукцию компонентов межклеточного

матрикса и активирующий пролиферацию и миграцию клеток, и фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) – фактор, который стимулирует пролиферацию миофибробластов и ангиогенез поврежденного участка паренхимы [34, 125].

На поздних стадиях фиброза в печени содержится примерно в шесть раз больше нормы компонентов внеклеточного матрикса, включая коллагены (I, III и IV), фибронектин, ундулин, эластин, ламинин, гиалуроновую кислоту и протеогликаны [30, 31].

1.7. Неинвазивная диагностика фиброза печени

Одним из важных аспектов БВК является своевременная диагностика, которая позволяет предотвращать развитие необратимых и жизнеугрожающих состояний, а именно цирроз печени.

Определение стадии фиброза имеет ключевое значение для прогнозирования течения БВК, выбора терапевтической тактики, а также разработки антифибротической терапии. В настоящее время пункционная биопсия печени остается «золотым стандартом» диагностики БВК при недоступности генетического тестирования, позволяя оценить стадию фиброза, активность воспаления и сопутствующие изменения (стеатоз, накопление меди или железа), однако её диагностическая ценность ограничена гетерогенным распределением поражений и малым объёмом исследуемой паренхимы [2]. Несмотря на высокую информативность, метод не всегда отражает истинную картину поражения печени, что требует комплексной оценки с учётом клинических, лабораторных и инструментальных данных [97]. Поэтому в современной гепатологии большое внимание уделяется неинвазивной диагностике фиброза печени и маркерам его прогрессирования, включая серологические показатели и инструментальные методы. Эти подходы не только могут заменить биопсию, но и помочь в определении новых терапевтических мишеней [123].

Наиболее изученным и внедренным в клиническую практику неинвазивным методом диагностики является транзиентная эластография (FibroScan),

обладающая высокой воспроизводимостью и точностью в диагностике выраженного фиброза и цирроза у пациентов с хроническими вирусными и аутоиммунными гепатитами, метаболически-ассоциированной жировой болезнью печени, гемохроматозом, первичным билиарным холангитом, БВК [36, 42, 66, 123].

Помимо инструментальных методов, перспективным направлением является изучение биомаркеров фиброза, которые можно разделить на прямые (отражающие процессы ремоделирования внутриклеточного матрикса (ВКМ): коллагены I, III, IV, VI типов, гиалуроновая кислота, цитокины) и непрямые (косвенно свидетельствующие о повреждении печени: АЛТ, АСТ, ГГТ, билирубин, тромбоциты и др.) [118].

Некоторые из прямых маркеров фиброза хорошо изучены: доказано участие коллагенов I, IV типов и гиалуроновой кислоты в процессе фиброзирования на основании выявленных взаимосвязей их сывороточных концентраций с морфологической стадией фиброза, а также определены пороговые значения для различных стадий фиброза [15].

Роль цитокинов 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 [126]. У пациентов с МАЖБП повышение уровня TGF-β1 может отражать степень стеатоза и воспаления, тогда как установить причины его снижения при выраженном фиброзе не удалось [99]. Уровень PDGF-BB в сыворотке крови также снижается по мере прогрессирования фиброза у больных хроническими гепатитами В и С (ХГВ, ХГС), достигая минимальных значений при циррозе, что может быть связано с тромбоцитопенией, развивающейся в рамках синдрома гиперспленизма [70]. 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.

Ограниченность и противоречивость научных данных, особенно при различных нозологических формах хронических заболеваний печени,

свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения вовлеченности этих цитокинов в механизмы развития фиброза.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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.).

2.1. Дизайн исследования и характеристика пациентов

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

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 методов исследования в соответствии с клиническими рекомендациями «БВК».

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 пациентов 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.

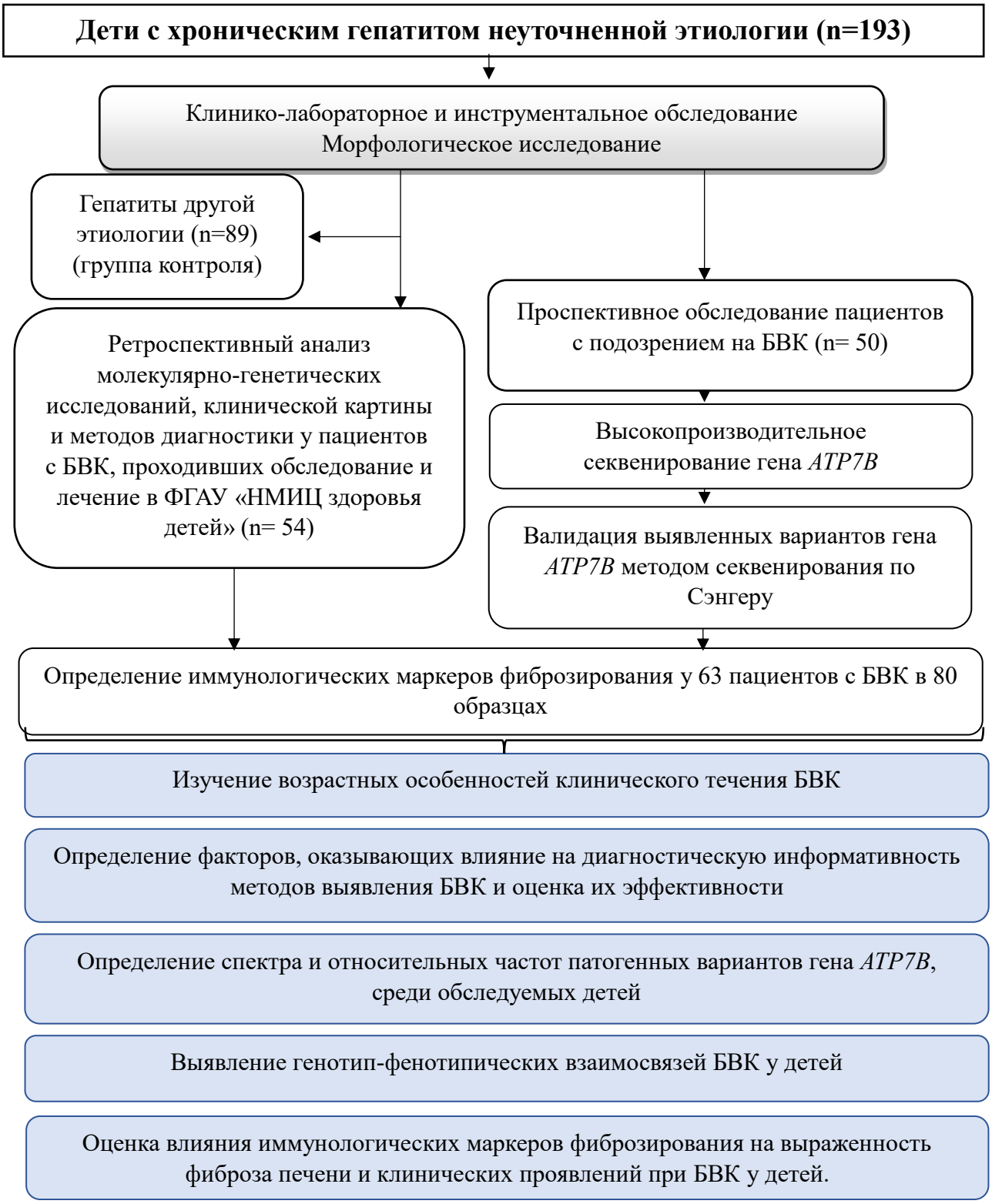


Рисунок 1. Дизайн исследования: ретроспективно-проспективное нерандомизированное неконтролируемое исследование.

Критерии включения:

1) Ретроспективная часть:

- пациенты мужского и женского пола в возрасте от 3 лет до 17 лет 11 месяцев с диагнозом БВК, установленным на основе балльной шкалы диагностики Лейпциг 2001г. и с проведенным обследованием, включающим лабораторное (общий анализ крови, биохимический анализ крови, коагулограмма, определение уровня церулоплазмина, суточной экскреции меди с мочой), инструментальное (УЗИ органов брюшной полости, фиброэластометрия, МРТ органов брюшной полости и головного мозга) обследование, молекулярно-генетическое исследование, направленное на поиск каузальных вариантов в гене *ATP7B* и морфологическое исследования печени (по показаниям).

2) Проспективная часть:

- пациенты мужского и женского пола в возрасте от 3 лет до 17 лет 11 месяцев с подозрением на БВК с проведенным обследованием, включающим лабораторное (общий анализ крови, биохимический анализ крови, коагулограмма, определение уровня церулоплазмина, суточной экскреции меди с мочой), инструментальное (УЗИ органов брюшной полости, фиброэластометрия, МРТ органов брюшной полости и головного мозга) обследование, которым будет проведено молекулярно-генетическое исследование с целью поиска казуальных вариантов в гене *ATP7B*;
- пациенты мужского и женского пола в возрасте от 3 лет до 17 лет 11 месяцев с установленным диагнозом БВК, с проведенным обследованием, включающим лабораторное (общий анализ крови, биохимический анализ крови, коагулограмма, определение уровня церулоплазмина, суточной экскреции меди с мочой), инструментальное (фиброэластометрия) обследование, у которых будет проведено определение сывороточной концентрации маркеров фиброзирования (TGF-β, PDGF-BB, CTGF и VEGF);
- наличие добровольного информированного согласия на проведение обследований и на участие в исследовании.

Критерии невключения:

- Возраст младше 3 лет и старше 18 лет;
- Отсутствие результатов лабораторного (общий анализ крови, биохимический анализ крови, коагулограмма, уровень церулоплазмина, суточная экскреция меди с мочой), инструментального (УЗИ органов брюшной полости, фиброэластометрия, МРТ органов брюшной полости и головного мозга) обследования, молекулярно-генетического исследования для ретроспективных пациентов;
- Плохое качество исследования и невозможность точной интерпретации полученных результатов;
- Отсутствие добровольного информированного согласия на проведение обследований и на участие в исследовании.

Исследование проведено в соответствии с Хельсинской декларацией[1]. Информированное согласие получено от всех пациентов в возрасте 14–18 лет и от родителей пациентов, не достигших 14-летнего возраста[2].

Исследование было утверждено на заседании Ученого совета, протокол № 5 от 27.06.2023 и одобрено этическим комитетом ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, протокол №3 от 30.03.2023 г.

2.2. Методы исследования

С целью изучения катамнеза детей с БВК проанализированы жалобы, данные анамнеза жизни и болезни, результаты проведенного лабораторного и инструментального обследования.

Диагноз БВК устанавливался согласно Лейпцигской шкале диагностики [2] и шкале Nagral A. 2019г. [94], включающие параметры, отражающие метаболизм меди: определялись концентрация церулоплазмина в крови, суточная экскреция

[1]Принята в июне 1964 г. (Хельсинки, Финляндия) и пересмотрена в октябре 2000 г. (Эдинбург, Шотландия).

[2] Согласно Федеральному закону «Основы законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан» от 22.07.1993 № 5487-1.

меди с мочой в нативном состоянии и на фоне Д-пеницилламина, количественное содержание меди в биоптатах печени, наличие колец Кайзера-Флейшера при офтальмологическом осмотре при помощи щелевой лампы и признаков поражения головного мозга с помощью магнитно-резонансной томографии.

Таблица 4. Шкалы диагностики БВК [94, 143].

Критерии шкал	Leipzig (2001)		Nagral (2019)	
	Параметр	баллы	Параметр	баллы
Церулоплазмин	> 20 мг/дл 11 -20 мг/дл <10 мг/дл	0 1 2	> 20 мг/дл 0 – 5 мг/дл 6 -11 мг/дл 11-20 мг/дл	0 3 2 1
Суточная экскреция меди с мочой	> 2 норм **ИЛИ** в норме, но увеличение более 5 норм при **пробе с пеницилламином** 1-2 нормы Норма	2 1 0	>100 мкг 40-100 мкг <40 мкг	2 1 0
Кольца Кайзера-Флейшера	Есть Нет	2 0	Есть Нет	2 0
Признаки поражения ЦНС и/или изменения на МРТ	выраженные умеренные отсутствуют	2 1 0	Неврологические симптомы Изменения на МРТ	2 1
Кумбс-негативная гемолитическая анемия	Есть Нет	1 0	Есть Нет	1 0
Биопсия печени	- Количественное определение меди >250 мкг/г 50-250 мкг/г в норме (ниже 50 мкг/г) - Родамин – позитивные гепатоциты присутствуют	 2 1 - 1 1	 - Родамин – позитивные гепатоциты присутствуют	 1
Семейный анамнез	Нет		Семейный анамнез или смерть сибса от БВК	1
Генетическое исследование	Компаунд-гетерозигота/ Гомозигота Гетерозигота	 4 1	Компаунд-гетерозигота/ Гомозигота Гетерозигота	 4 1
Интерпретация: 4 и более: диагноз БВК установлен; 3: диагноз БВК вероятен, но требуется дальнейшее обследование пациента; 2 и менее: диагноз БВК сомнителен.				

Клинический анализ крови, биохимический анализ крови с определением стандартных показателей выполняли в центральной клинико-диагностической лаборатории ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава. Исследования проводились на анализаторах Mindray BS-800M и Mindray BC-6800Plus (Китай) соответственно. Определение концентрации церулоплазмина в сыворотке крови проводилось иммунотурдибиметрическим методом на аппарате Cobas c 311 (Франция). Нормальные значения вне зависимости от метода считались 20-40 мг/дл.

Уровень суточной экскреции меди с мочой и содержание меди в биоптатах печени определяли количественно 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» (заведующая отделением Кузьмина Л.Н.). Проба с Д-пеницилламином оценивалась на основании уровня суточной экскреции меди с мочой после прием Д-пеницилламина 1000 мг/сут (по 500 мг с интервалом 12 часов) вне зависимости от возраста. Нормальными считались значения для нативной суточной экскреции меди с мочой – 50 мкг/сут, для пробы с Д-пеницилламином менее 250 мкг/сут. При оценке количественного содержания меди в ткани печени нормальными считались значения менее 50 мкг/г сухого вещества печени.

Визуализация колец Кайзера-Флейшера проводилась на базе клинико-диагностического центра ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России (руководитель клинико-диагностического центра – к.м.н. Петрачкова М.А.).

Пункционная биопсия печени проведена 12 детям врачами-хирургами торакального отделения ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России (заведующий отделением – д.м.н. Алхасов А.Б.).

Для определения чувствительности и специфичности критериев диагностики БВК были обследованы 89 детей (44 мальчика и 45 девочек) в возрасте от 3 до 17 лет и 11 месяцев с хроническим гепатитом другой этиологии: аутоиммунный гепатит (n=35), в составе overlap-синдрома аутоиммунный гепатит с холангитом (n=13), первичный склерозирующий холангит (n=8), инфекционные и токсические

гепатиты (n=25), другие генетические заболевания, протекающие с поражением печени (n= 6), метаболически ассоциированная жировая болезнь печени (n=2).

Диагностические мероприятия, направленные на исключение БВК проводились на этапе дифференциальной диагностики гепатита до назначения терапии. Алгоритм обследования осуществлялся на основании клинических рекомендаций МЗ РФ по БВК [144]: на первом этапе проводилось определение концентрации церулоплазмина (n=89), в случае сомнительного результата проводилась оценка нативной суточной экскреции меди с мочой (n=46), по результатам которой определялась необходимость проведения пробы с Д-пеницилламином (n=12).

Молекулярно-генетическая диагностика проводилась в лаборатории медицинской геномики Медико-генетического центра ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» МЗ РФ, за исключением пациентов, которым проводили исследование 12 частых мутаций в гене *ATP7B* методом аллель-специфичной ПЦР с последующим гельэлектрофорезом (для каждого образца и для каждого нуклеотидного варианта проводили 2 реакции ПЦР: в первую добавляли праймер, специфичный для мутантного аллеля и универсальный обратный праймер, во вторую добавляли праймер специфичный для аллеля дикого типа и также универсальный обратный праймер. При последующем форезе в агарозном геле наличие полосы в реакции 1 свидетельствовало о присутствии мутантного аллеля, а в реакции 2 - дикого типа. Таким образом наличие только одной полосы было признаком гомозиготного варианта, а одновременная амплификация нормального и мутантного аллелей указывала на гетерозиготное носительство).

В ретроспективной группе пациентов (n=54), из которой в связи с отсутствием биологического материала и обнаружением только одного гетерозиготного варианта в гене *ATP7B* были исключены 4 ребенка поиск «частых мутаций» в гене *ATP7B* методом ПЦР был проведен у 52% (26/50) детей, биаллельные варианты выявлены у половины из них (13/26 детей). Остальным 50% детей, у которых обнаружен только один вариант, было проведено дополнительное молекулярно-генетическое обследование, включающее секвенирование по Сэнгеру

или ВПС. У 4% (2/50) детей были исследованы 8, 13-20 экзоны методом секвенирования по Сэнгеру, при этом только у одного пациента был выявлен один вариант, второй - обнаружен при повторной диагностике с помощью метода ВПС. У оставшихся 44% (22/50) больных в качестве метода молекулярно-генетической диагностики применялось двунаправленное секвенирование по Сэнгру, по результатам которого у всех были обнаружены биаллельные варианты.

В проспективной части исследования (n=50) у всех детей поиск вариантов проводился анализ таргетных (кодирующих и прилегающих интронных) областей гена *ATP7B* методом ВПС, валидация выявленных вариантов проводилась с помощью двунаправленного секвенирования по Сэнгеру.

Выделение геномной ДНК осуществляли на автоматической станции QIAQUBE (QIAGEN, Германия) с помощью набора реактивов DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Германия). Оценку качества и количества, выделенных образцов нуклеиновых кислот, осуществляли при помощи спектрофотомера NanoPhotometer N60 (Implen, Германия) и флуориметра нового поколения Qubit 3.0 (Invitrogen, США). Для приготовления геномных библиотек и их обогащения использовали реагенты KAPA HyperPlus Kit и KAPA HyperCap (Roche, США).

Секвенирование проводили на платформах MiSeq и Nextseq 550 (Illumina, Сан-Диего, Калифорния, США). Биоинформатический анализ данных осуществлялся в соответствии с рекомендациями GATK Best Practices (https://gatk.broadinstitute.org/). Предсказание патогенности вариантов, не описанных ранее, определяли при помощи in silico анализа в программе Alamut Visual (Interactive Biosoftware, Франция) со встроенными биоинформатическими программными модулями SIFT, PolyPhen HDIV, PolyPhen HVAR, Mutation Taster, FATHMM, CADD13, DANN, M-CAP, REVEL, а также в соответствии с рекомендациями ACMG и руководства по интерпретации данных последовательности нуклеотидов ДНК человека.

Валидация выявленных вариантов проводилась с помощью двунаправленного секвенирования 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 использовали метод ПЦР в режиме реального времени с использованием смеси с интеркалирующим красителем iQ™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, США).

Для оценки частот минорных аллелей выявленных вариантов использована Genome Aggregation Database (gnomAD) NM_000053.4. Для определения клинической релевантности выявленных вариантов использованы база данных OMIM и база данных по патогенным вариантам HGMD® Professional версия 2023.2, литературные данные. Для оценки интронных вариантов, расположенных не в канонических сайтах сплайсинга, использовались программы-предсказатели влияния на сайт сплайсинга (SPiP.SpliceAi,Pangolin).

Во второй части проспективного исследования у 63 детей с установленной БВК в 80 образцах методом иммуноферментного анализа в венозной крови были исследованы следующие биомаркеры: трансформирующий фактор роста бета (TGF-β), тромбоцитарный фактор роста BB (PDGF-BB), фактор роста соединительной ткани (CTGF), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), с использованием наборов для ИФА: RayBio® Human ELISA Kit (США) для определения TGF-β, PDGF-BB, CTGF и «VEGF-ИФА-БЕСТ» Вектор-Бест (Россия) для определения VEGF. Исследование проводилось по стандартизированной методике.

Промывку лунок микропланшета осуществляли с помощью микропланшетного промывочного устройства HydroFlexTM (Австрия). Считывание результатов иммуноферментного анализа производили с помощью микропланшетного фотометра TECAN SunriseTM (Австрия). Полученные данные обрабатывали с помощью программного обеспечения TECAN MagellanTM V6.5 (Австрия).

Измерение плотности печени проводилось методом непрямой транзиентной фиброэластометрии на аппарате FibroScan® compact 530 (Echosence, Франция). Стадии фиброза дифференцировались согласно шкале METAVIR [14].

2.3. Методы статистической обработки данных

Статистический анализ проводился с использованием программы IBM SPSS Statistics, версия 26.0 (IBM Software, США).

Нормальность распределения количественных показателей оценивалась с помощью критериев: Шапиро-Уилка (число исследуемых менее 50) и Колмогорова-Смирнова (число исследуемых более 50). Количественные переменные, имеющие отличное от нормального распределение, представлены медианой (Me) и межквартильным интервалом (Q1-Q3). Категориальные данные представлены в виде абсолютных и процентных долей.

Для сравнения категориальных данных проводился анализ четырехпольных таблиц с дальнейшим использованием критериев Фишера и x^2 Пирсона. Для оценки воздействия факторов проводился расчет отношения шансов (ОШ) с указанием 95% ДИ. Оценка связи проводилась по V Крамера.

Для сравнения двух групп по количественному показателю применялся U критерий Манна-Уитни. Для сравнения трех и более групп - критерий Краскела-Уоллиса. Анализ корреляционных связей между переменными проводился при помощи коэффициента ранговой корреляции Спирмена с определением тесноты связи по шкале Чеддока. Сравнение связанных совокупностей проводился с использованием парного критерия Уилкоксона.

Диагностическая значимость, оптимальное соотношение чувствительности и специфичности критериев диагностики (количественных) и определение cut-off проводилась с использованием ROC-кривых. Уровень статистической значимости принимался при $p<0,05$.

Глава 3. ОСОБЕННОСТИ КЛИНИЧЕСКОГО ТЕЧЕНИЯ БВК У ДЕТЕЙ И ИНФОРМАТИВНОСТЬ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ И ШКАЛ

Раздел написан в соответствии с материалами, опубликованными в собственных статьях:

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.[8]

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.[10]

3.1. 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, который впоследствии не получала терапию и развил абдоминальную форму (рисунок 2). 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.

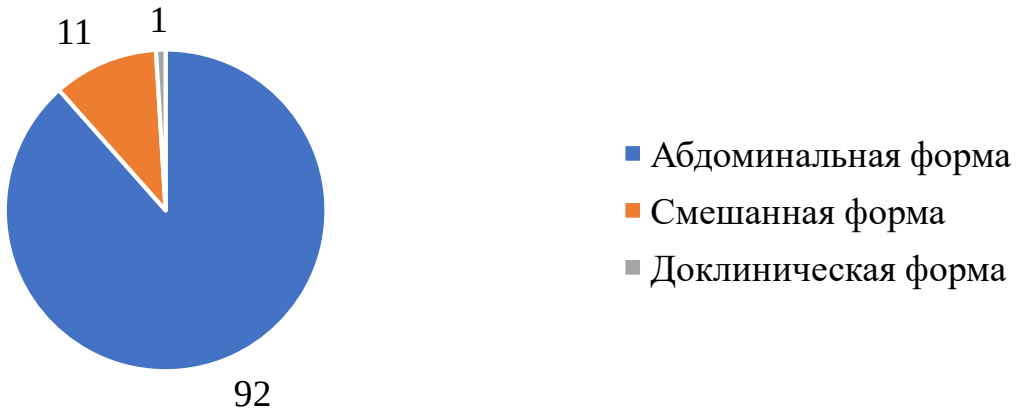


Рисунок 2. Распределение пациентов по формам БВК.

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 3), 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.

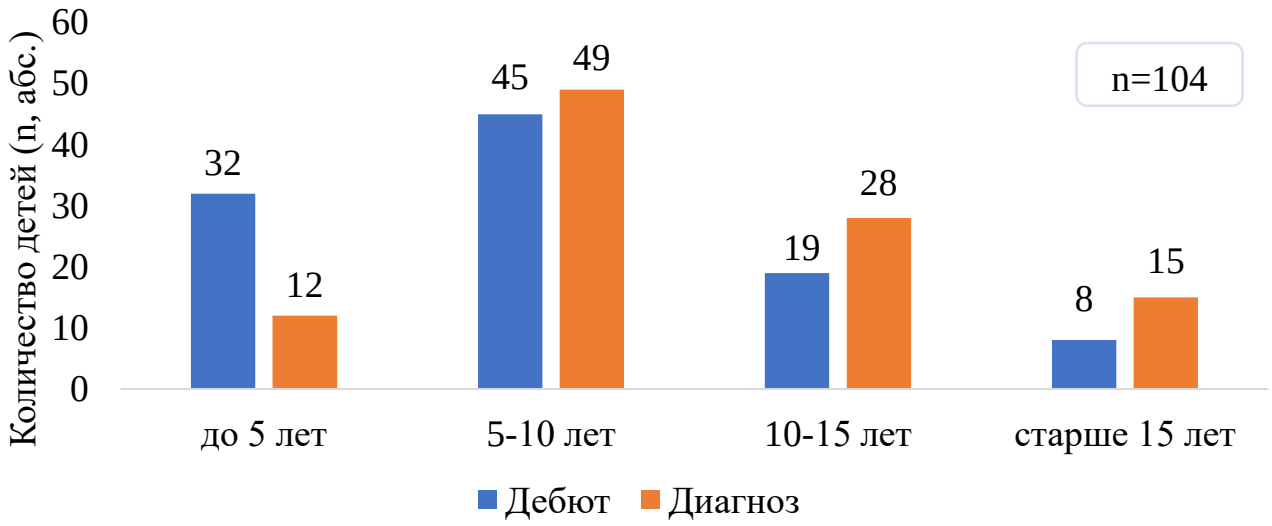


Рисунок 3. Возраст дебюта и постановки диагноза БВК у детей в различных возрастных группах.

В большинстве случаев (82%, 85/104) дети были направлены на дополнительное обследование в связи со стойким цитолизом или УЗ-изменениями паренхимы и размеров печени, которые чаще обнаруживались случайно при диспансерном обследовании (29/104 - 28%) и при диагностических мероприятиях по поводу интеркуррентных заболеваний (41/104 - 39%). Клинические симптомы, такие как диспепсические проявления, эпистаксис, желтуха, отеки, тремор, снижение когнитивных функций отмечались лишь у 18% (19/104) детей. Отягощенная наследственность по БВК была у 19% (20/104) пациентов, при этом у 15% (15/104) пациентов она стала причиной обследования (рисунок 4). В 25 % (5/20) семейных случаев у старших сибсов наступил летальный исход.

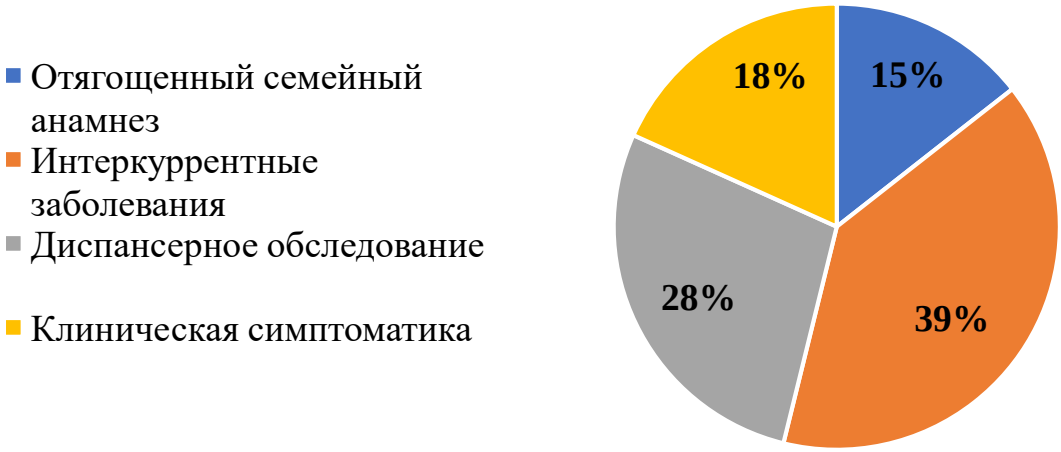


Рисунок 4. Причины обследования детей в дебюте БВК.

При поступлении в стационар у 56% (58/104) пациентов уже был установлен клинический диагноз БВК, из других направляющих диагнозов на первом месте был хронический гепатит неуточненный - 32% (33/104) детей, на втором - цирроз печени различной степени тяжести - 7% (8/104) детей, на третьем - стеатоз/стеатогепатит - 2% (2/104) пациентов (рисунок 5)

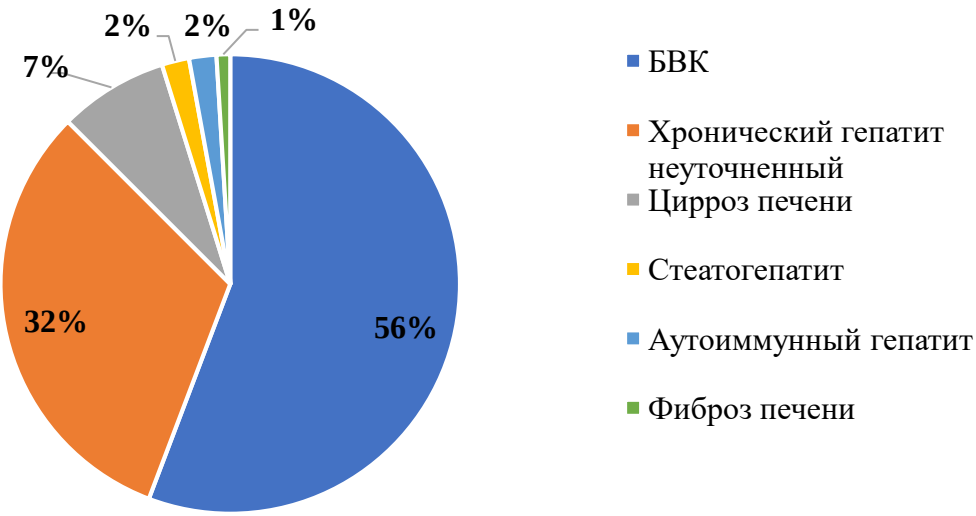


Рисунок 5. Направляющие диагнозы при поступлении в стационар.

Среди пациентов с абдоминальной и смешанной формой БВК превалировали мальчики, 70% (64/92) и 64% (7/11) соответственно. При сравнении частоты

абдоминальной или смешанной формы в зависимости от пола пациентов нами не было получено значимых различий (p = 0,688).

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%. Полный список клинических проявлений при поступлении представлен на рисунке 6.

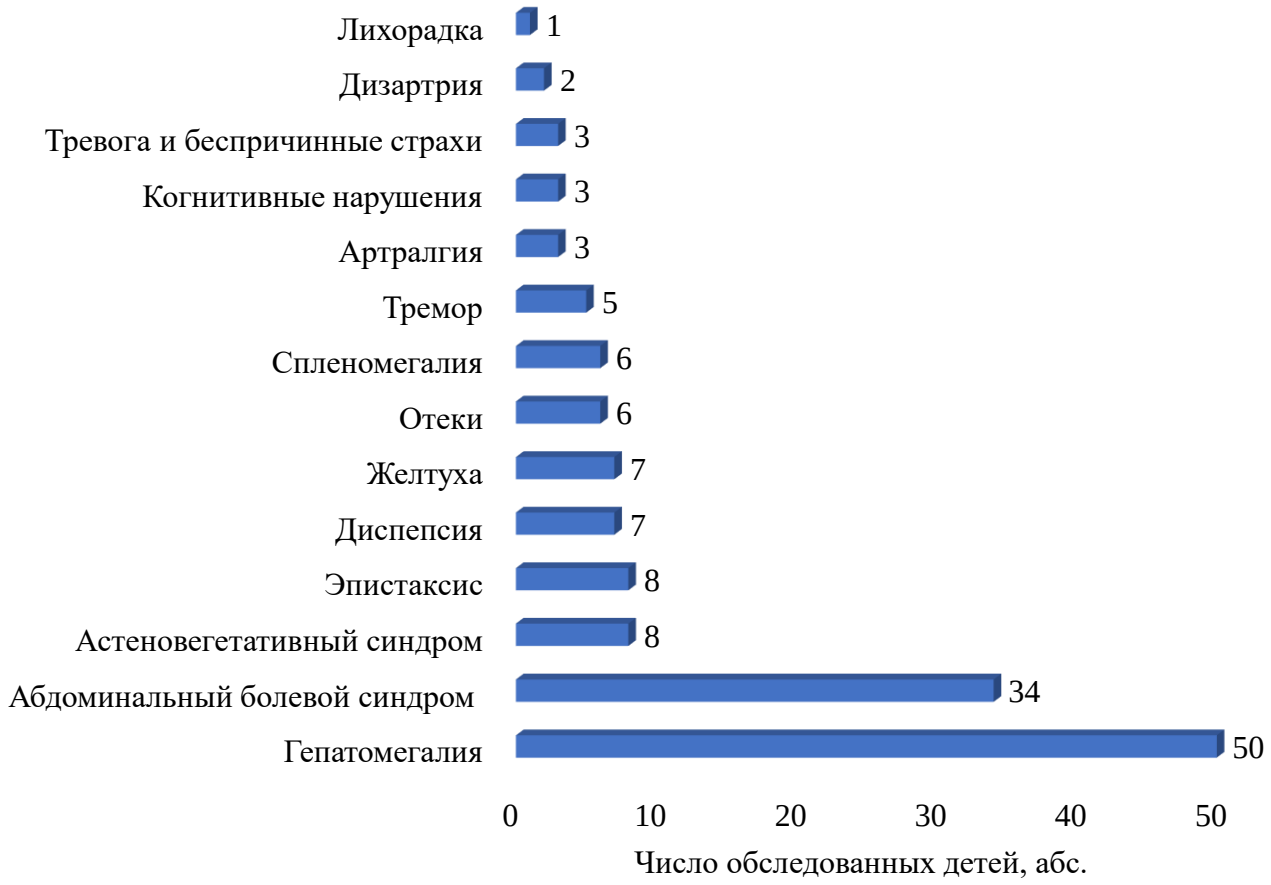


Рисунок 6. Спектр клинических проявлений БВК у детей.

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.

Перечень основных лабораторных изменений при первичном обследовании представлен в таблице 5.

Таблица 5. Доля пациентов с измененными лабораторными показателями при первичном обследовании.

Анемия (гемоглобин < 110 г/л)	1,9%
Лейкопения (< 4,5х10^9/л)	10,5%
Тромбоцитопения (< 150х10^9/л)	8,6%
Эритропения (< 4х10^12/л)	6,7%
Ускорение СОЭ (>20 мм/час)	3,8%
Цитолиз (> 40 Ед/л)	до 2 норм – 21% 2-5 норм – 27% 5-10 норм – 44% более 10 норм – 8%
ГГТ (>35 Ед\л)	69,2%
Гипербилирубинемия (>20,5 мкмоль/л)	14,4%
Гиперхолестеринемия (>5,2 ммоль/л)	21,1%
Гипертриглицеридемия (>1,6 ммоль/л)	21,1%
Гипергаммаглобулинемия (>14 г/л)	8,6%
Гипопротеинемия (<60 г/л)	3,8%
Гипоальбуминемия (<38 г/л)	10,5%

3.2. Сравнительная оценка диагностической ценности лабораторных и инструментальных методов

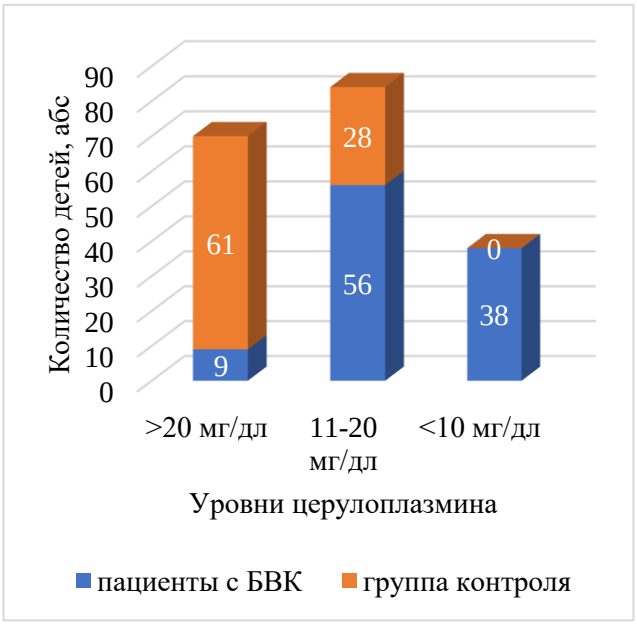
Первоначальная диагностика БВК заключалась в определении концентрации церулоплазмина (n = 103) в сыворотке крови, медиана составила 11 [5,9;15,1] мг/дл. У 54% (56/103) пациентов уровень церулоплазмина находился в диапазоне 11–20 мг/дл, у 37% (38/103) был <10 мг/дл, а у 9% (9/103) больных – в пределах нормальных значений (рисунок 7А).

Не было выявлено статистически значимых различий в уровнях данного маркера между возрастными группами на момент диагностики БВК (p =0,965), а

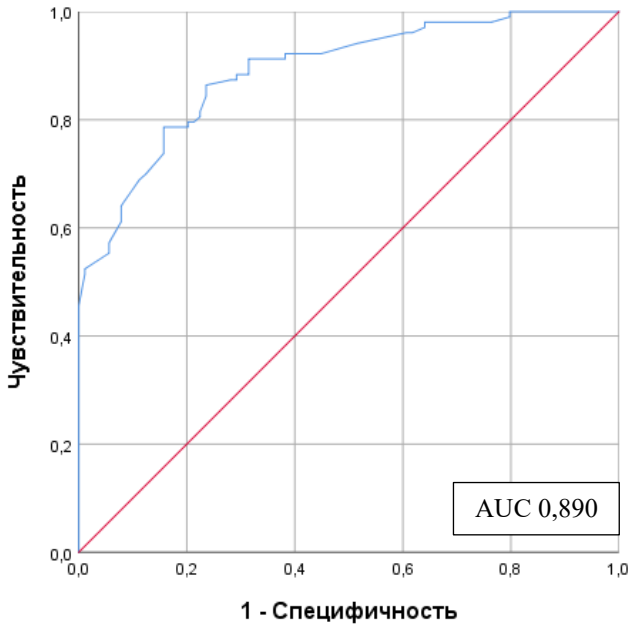
также между пациентами с абдоминальной и смешанной формой, 11 [5,9; 15,05] мг/дл и 11 [5,9; 16,9] мг/дл соответственно (p = 0,966).

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 7А), из них у 68% (19/28) это было связано со снижением белково-синтетической функции печени при циррозе, у 21% (6/28) – на фоне хронического гепатита другой этиологии, у 4% (1/28) пациентов в результате острой печеночной недостаточности, 7% (2/28) детей были носителями 1 патогенного варианта гена *ATP7B*, обнаруженного в рамках семейного сегрегационного анализа.

А



Б



Рисноук 7: А- концентрация церулоплазмина у пациентов с БВК и в группе контроля; Б- результат ROC-анализа, показывающий возможность диагностики БВК у детей с помощью церулоплазмина.

Незначительное снижение церулоплазмина у пациентов с заболеванием печени может обуславливать сложность проведения дифференциальной диагностики и приводить как к ложноположительным, так и ложноотрицательным результатам. Несмотря на это, 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 7Б).

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 8А).

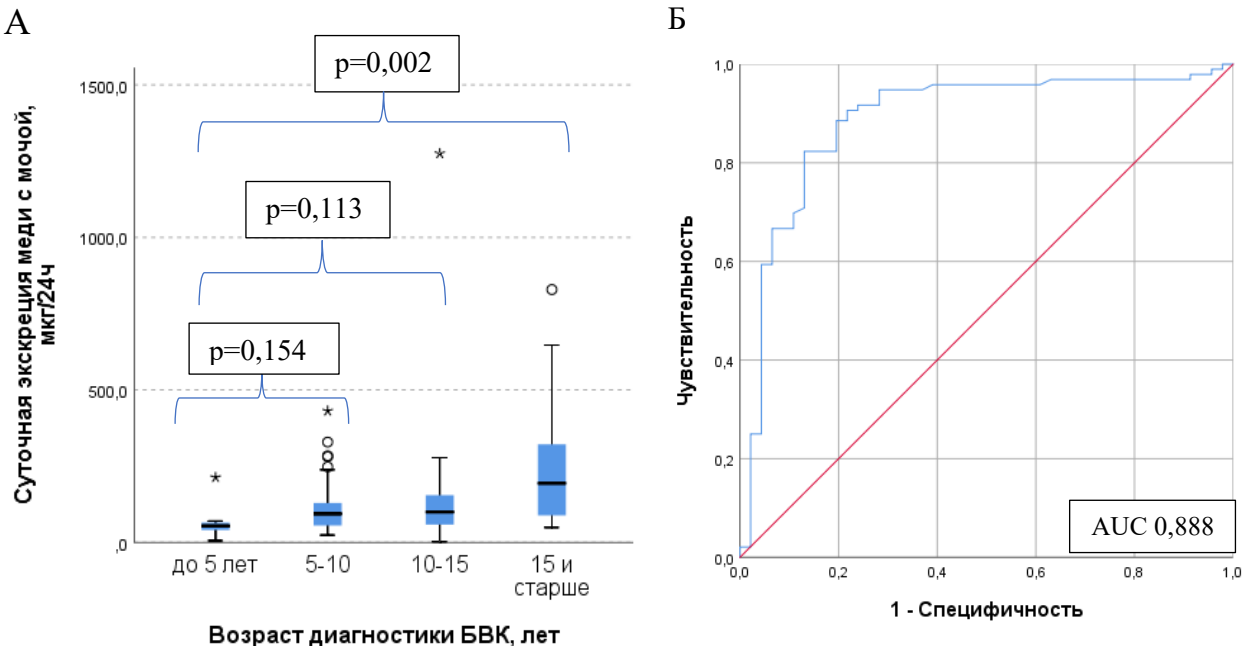


Рисунок 8: А - показатели уровня суточной экскреции меди с мочой у пациентов с БВК различных возрастных групп; Б- результат ROC-анализа, показывающий возможность диагностики БВК у детей с помощью суточной экскреции меди с мочой.

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 ($p < 0,001$). У 87% (40/46) детей уровень экскреции находился в пределах нормальных значений, сомнительные результаты (50-100 мкг/сут) – получены у 9% (4/46), и только у 4% (2/46) пациентов с аутоиммунным гепатитом в сочетании с выраженным холестазом экскреция составила более 100 мкг/сут.

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 8Б).

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).

Нами также 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) (таблица 6).

У 29,6% (16/54) пациентов провокационный тест мог бы не проводиться, поскольку уровень их нативной суточной экскреции меди в моче был более 100 мг/сут, в данной группе только у 37,5% (6/16) детей значения пробы были более 1600 мкг/сут.

Таблица 6. Значения пробы с Д-пеницилламином у детей с различным уровнем суточной экскреции меди с мочой

Уровень нативной суточной экскреции меди с мочой	n пациентов	Проба с Д-пеницилламином (мкг/сут)		p
		Me	Q1-Q3	
1 - Нормальный (<50 мкг/сут)	12	570	315,1-889,8	p=0,027 p0-1=0,618 p0-2=0,025 p1-2=0,238
2 - Сомнительный (50-100 мкг/сут)	25	669	488,9-1116,2	
3 - Положительный (>100 мкг/сут)	17	1033	795,0-1790,0	

В группе детей с отрицательным или сомнительным результатом (0/1 баллов по Лейпцигской шкале) нативной суточной экскреции меди с мочой (n=38) использование порогового значения ≥1600 мкг/сут позволило повысить балл до 2 лишь у 10,5% (4/38) детей, в отличие от применения более низкого уровня (5-кратное увеличение уровня суточной экскреции меди в моче) – 55,2% (21/38) пациентов.

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 уровней показателей чувствительности и специфичности не удалось. Уровень более 250 мкг/сут обладал высокой чувствительностью (92%) и низкой специфичностью (18%), в то время как 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 9).

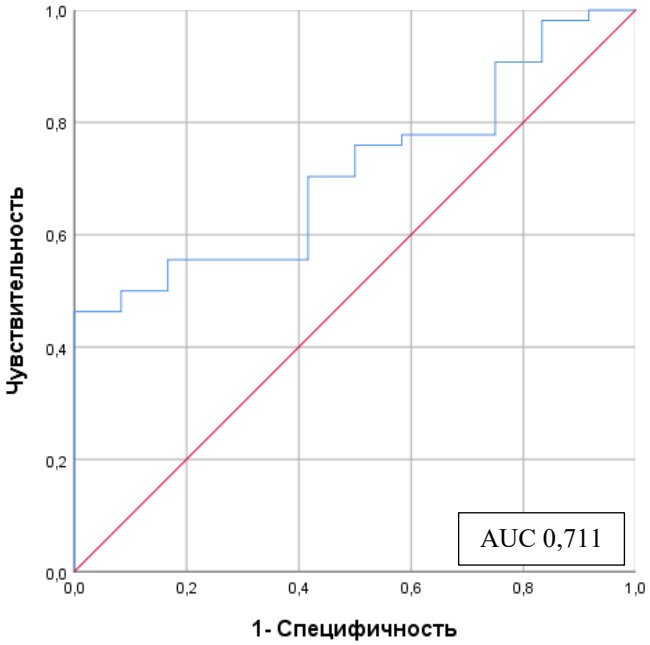


Рисунок 9. Результат ROC-анализа, показывающий возможность диагностики БВК у детей с помощью пробы с Д-пеницилламином.

Биопсия печени проведена у 11,5% (12/104) пациентов, среднее значение количества меди в ткани печени составило 287,5 [217,3;468,0] мкг/г: у 75% (9/12) пациентов значения были выше 250 мкг/г, у 25% (4/12) находились в диапазоне 50-250 мкг/г.

Данный параметр не зависел от возраста пациентов на момент диагностики БВК (p=0,088). Ни у одного из 12 пациентов при проведении специфического окрашивания ткани родамином не было получено положительного результата.

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 1 ребенка на фоне терапии Д-пеницилламином в течение 1 года было обнаружено билатеральное очаговое поражение белого вещества головного мозга и базальных ганглиев при отсутствии неврологических симптомов.

Таблица 7. Возрастные параметры у пациентов с различными формами БВК и степенью фиброза печени.

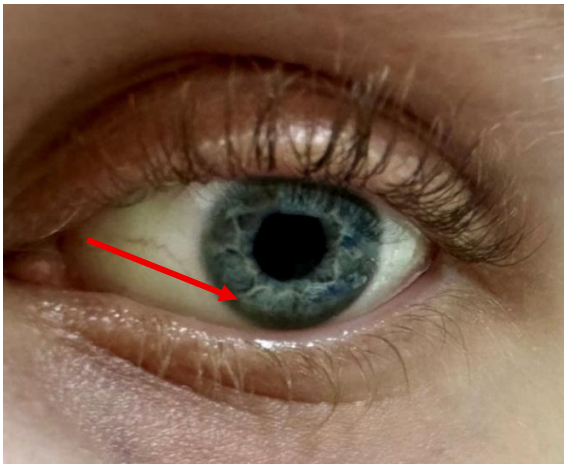
Показатели	Группа детей с БВК (n=104)					
	Неврологические проявления		p	Цирроз печени		p
	Есть (n=11)	Нет (n=93)		Есть (n=11)	Нет (n=93)	
Возраст дебюта БВК, лет	9 [5,5;12,8]	6,3 [4,6;9,7]	0,081	12,8 [10,1;15,3]	6 [4,5;9,2]	<0,001
Возраст постановки БВК, лет	12,9 [10,3;16,4]	9 [6,2;10,9]	0,003*	15,6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

В группах пациентов с неврологическим изменениями и циррозом печени значения среднего возраста дебюта и постановки диагноза БВК были значимо выше, чем в группе детей с отсутствием данных проявлений (таблица 7), 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) (рисунок 10). Нами не было выявлено статистически значимых различий в возрасте детей с наличием или отсутствием данного симптома.

Ни у одного ребенка на момент дебюта заболевания и верификации диагноза не было диагностировано Кумбс-негативной гемолитической анемии.



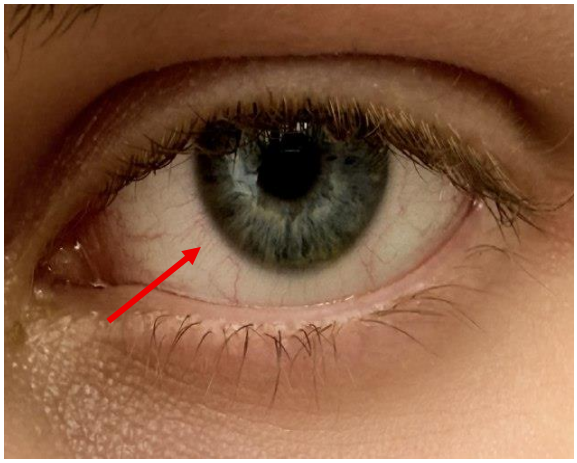


Рисунок 10. Кольца Кайзера-Флейшера, выявленные при осмотре у 2 пациентов со смешанной формой БВК.

3.3. Оценка информативности диагностических балльных шкал у детей

Диагностика БВК основана на Лейпцигской балльной шкале, которая включает клиническое, лабораторное, инструментальное и молекулярно-генетическое обследование, каждое из которых направлено на обнаружение нарушения метаболизма меди. Однако зависимость некоторых методов диагностики и симптомов от длительности течения заболевания и ограничение широкого применения молекулярно-генетического тестирования, ставит под сомнение информативность балльных шкал диагностики у детей, особенно раннего возраста.

Поскольку обнаружение биаллельных вариантов в гене *ATP7B*, позволяет установить диагноз без проведения дополнительных стандартных обследований, дальнейшее определение информативности шкал проводилось без учета результатов молекулярно-генетического тестирования.

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 11).

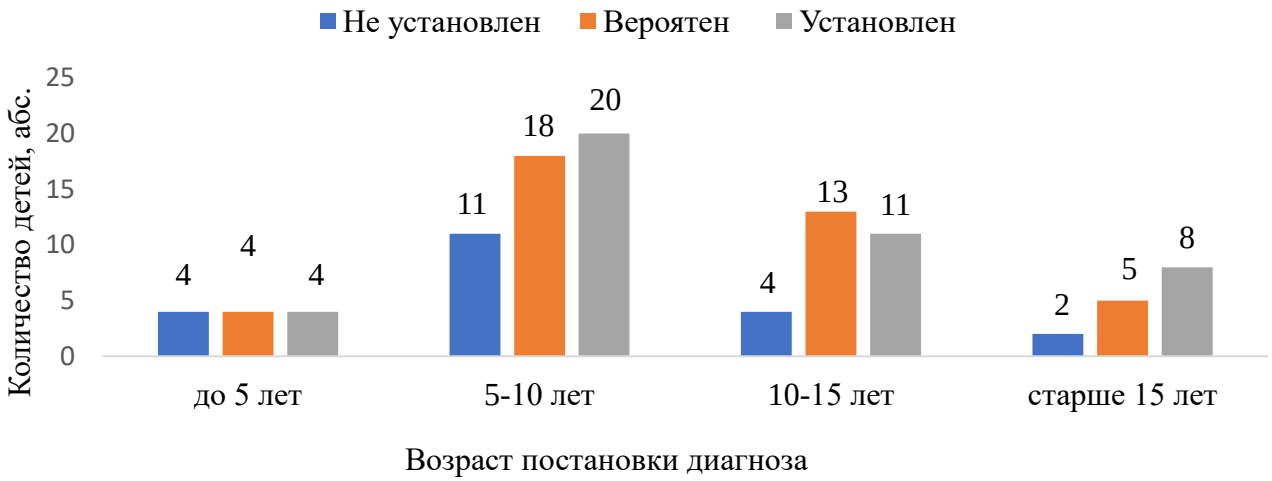


Рисунок 11. Диагностика БВК в различных возрастных группах согласно Лейпцигской шкале.

В контрольной группе (n=34) только у 5 (15%) пациентов диагноз БВК был вероятен (3 балла), что было связано со снижением концентрации церулоплазмина и повышением уровня нативной суточной экскреции меди с мочой у 1 пациента и у 4 детей - с положительной пробой с Д-пеницилламином.

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. 2019г. 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) (рисунок 12).

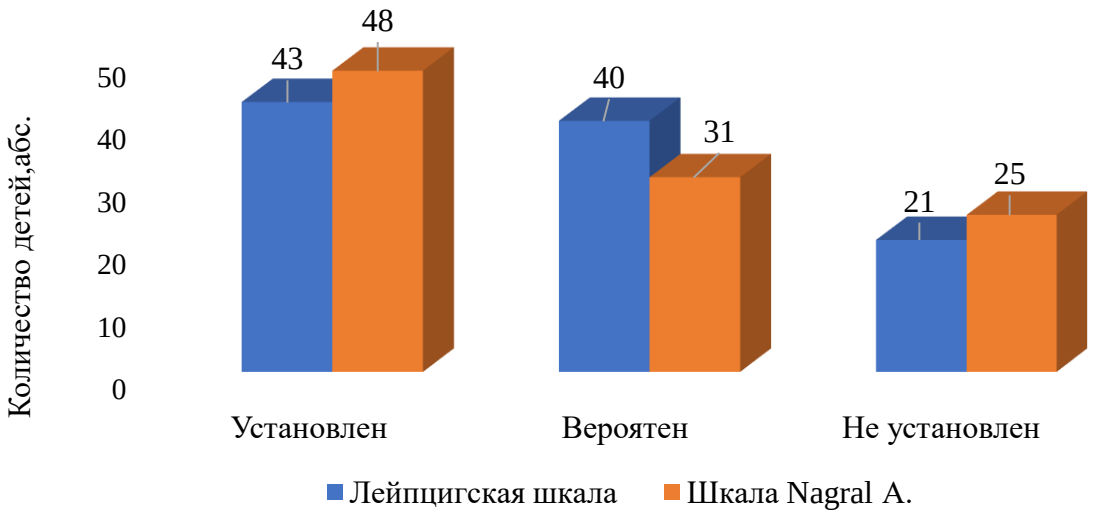


Рисунок 12. Установление диагноза БВК при использовании двух шкал без учета молекулярно-генетического исследования.

В группе пациентов с неустановленным диагнозом БВК (0-2 баллов) и вероятным (3 балла) согласно Лейпцигской шкале (n=61) при использовании шкалы Nagral A., 2019г. диагноз удалось установить 13 пациентам (21%) за счет отличной градации церулоплазмина и включению параметра «семейный анамнез».

В группе пациентов с установленным диагнозом (4 балла) (n= 43) при использовании модифицированной шкалы диагноз БВК не был подтвержден только

у 8 (19%) пациентов, что было связано с низким уровнем суточной экскреции с мочой и исключением результатов пробы с Д-пеницилламином.

В отличие от Лейпцигской балльной шкалы, при анализе информативности шкалы Nagral A. 2019г. 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 13).

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

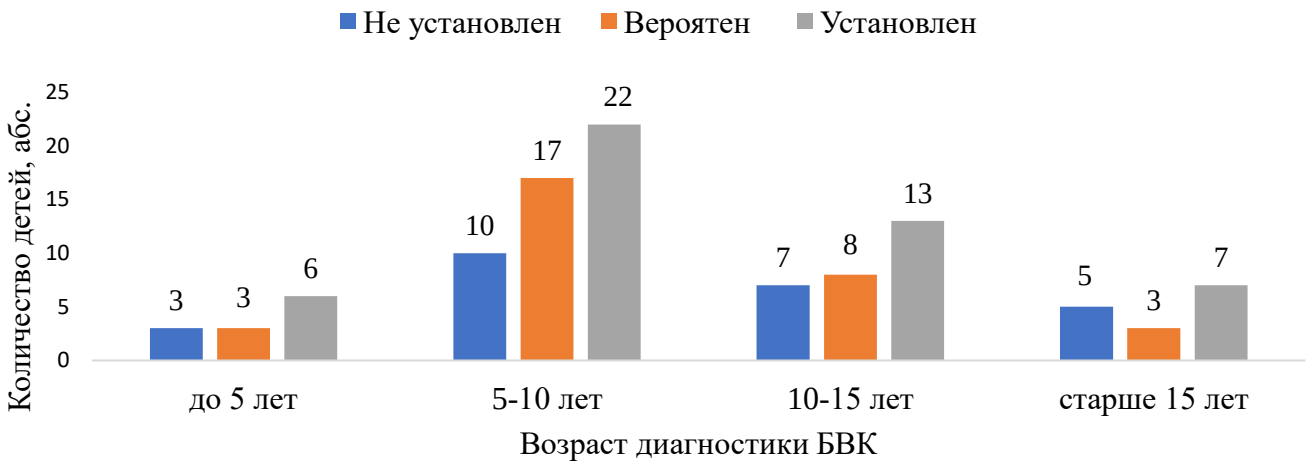


Рисунок 13. Диагностика БВК в различных возрастных группах согласно шкале Nagral A.

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 поднять чувствительность до 46,1%, при условии сохранения высоких уровней специфичности и прогностической точности 100%.

Таким образом, установлено преобладание у детей абдоминальной формы БВК с изолированным поражением печени в виде цитолиза и ультразвуковых изменений, тогда как формирование цирроза и неврологической симптоматики напрямую зависело от возраста диагностики. При анализе лабораторных маркеров

выявлено, что уровень церулоплазмина является наиболее стабильным и независимым от внешних факторов показателем, в то время как суточная экскреция меди с мочой, в том числе после провокационной пробы с Д-пеницилламином, продемонстрировала выраженную возрастную зависимость, что необходимо учитывать при интерпретации результатов у пациентов педиатрического возраста. Сравнительная оценка диагностических шкал показала, что шкала Nagral A. обладает преимуществом у пациентов до 5 лет благодаря модифицированной градации церулоплазмина и включению критерия «отягощенный семейный анамнез». Вместе с тем, обе шкалы без применения молекулярно-генетического тестирования обладают низкой чувствительностью, что ограничивает их использование для окончательной верификации диагноза БВК. Однако они могут быть эффективно применены в качестве инструмента первичного скрининга для формирования группы риска и отбора детей, нуждающихся в проведении генетического исследования.

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ №1

Мальчик, 4 г.

Из анамнеза жизни известно, что ребенок от 2-й беременности, протекавшей без особенностей, от 2 родов путем кесарева сечения. При рождении масса тела 2150 г. Период новорожденности - без особенностей. Рос и развивался в соответствии с возрастом. Перенесенные заболевания: ОРВИ, внебольничная левосторонняя пневмония. Аллергологический и наследственный анамнез не отягощены. Вакцинирован по индивидуальному календарю.

В возрасте 3 лет 10 месяцев, появились жалобы на боль в животе, снижение аппетита и ночной храп после перенесенного ОРВИ. При амбулаторном обследовании по месту жительства в биохимическом анализе крови отмечалось повышение уровня трансаминаз. По данным УЗИ брюшной полости- гепатомегалия, диффузные изменения паренхимы печени. Исключены целиакия, вирусные гепатиты, в том числе вызванные вирусом Эпштейн-Барра, цитомегаловирусом и герпес-вирусами 1 и 2 типа. При дополнительном обследовании церулоплазмин <3 мг/гл, суточная экскреция меди с мочой 28 мкг/сутки (норма 3 – 35). Фиброэластометрия печени: фиброз F2 по шкале METAVIR. Осмотрен офтальмологом – без патологии.

При госпитализации в гастроэнтерологическое отделение ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России физическое развитие среднее, гармоничное (вес -0,37 SD, рост -0,18 SD, ИМТ 14,8 -0,40 SD). Кожные покровы смуглой окраски, чистые от сыпи, умеренно влажные. Слизистые оболочки ротовой полости и глаз не изменены. Периферические лимфатические узлы не увеличены. Дыхание в легких везикулярное, сердечная деятельность удовлетворительная. Живот мягкий, безболезненный во всех отделах. Печень по краю реберной дуги, мягко-эластической консистенции. Селезенка не увеличена. Физиологические отправления не изменены. Неврологической симптоматики нет.

Проведено комплексное лабораторно-инструментальное обследование, по результатам которого в общем анализе крови отклонений не выявлено, в биохимическом анализе крови цитолиз и холестаз (АЛТ 140,88 Ед/л, АСТ 88,44

Ед/л, ЩФ 336,88 Ед/л, ГГТ 53,65 Ед/л, общий билирубин 7,53 мкмоль/л); гиперхолестеринемия 7,48 ммоль/л, повышение ЛВНП 4,65 ммоль/л, снижение альфа-1-антитрипсина 77 мг/дл, иммунологической активности нет, церулоплазмин 2,5 мг/дл (норма >20 мг/дл).

При УЗИ органов брюшной полости выявлены гепатомегалия, диффузные паренхиматозные изменения по типу жирового гепатоза. По данным фиброэластометрии фиброза печени не установлено (F0 по шкале METAVIR). По данным КТ органов брюшной полости: картина гепатомегалии; диффузные изменения паренхимы печени со снижением денситометрических показателей до 34-40 HU, что свидетельствует о жировой инфильтрации ткани печени. На МРТ головного мозга: очагового или объемного поражения вещества головного мозга не обнаружено. При осмотре врачом офтальмологом колец Кайзера-Флейшера не выявлено. Суточная экскреция меди с мочой (нативная): 75 мкг/л, 54 мкг/сут. Проба с Д-пеницилламином: 415 мкг/л, 199,2 мкг/сут.

Согласно Лейпцигской шкале у ребенка диагноз БВК был вероятен (3 балла), что было обусловлено только резким снижением уровня церулоплазмина (2 балла) в крови и незначительным повышением меди в моче (1 балл). Для уточнения диагноза проведено молекулярно-генетическое исследование методом ВПС, по результатам которого диагноз был подтвержден. Обнаружены биаллельные патогенные варианты в гене *ATP7B* в компаунд-гетерозиготном состоянии: делеция со сдвигом рамки считывания *c.3036dup* и миссенс-вариант *c.2293G>A*.

При этом использование алгоритма Nagral A. 2019 года, позволило бы поставить диагноз на момент первичного обследования до получения результатов молекулярно-генетического исследования, на что повлияла иная градация уровней церулоплазмина (3 балла вместо 2 баллов).

Данный клинический случай демонстрирует ограниченную чувствительность стандартных диагностических критериев Лейпцигской шкалы, 2001г. у детей раннего возраста, в то время как применение модернизированной шкалы, информативность которой была доказана в настоящем исследовании, позволяет установить диагноз на более ранних этапах, за счет предложенной

балльной градации уровня церулоплазмина. Этот случай подтверждает, что выраженная гипоцерулоплазминемия в сочетании с необъяснимым поражением печени является абсолютным показанием к проведению молекулярно-генетического исследования даже при отсутствии других классических диагностических критериев.

Глава 4. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕТЕЙ С БВК.

Раздел написан в соответствии с материалами, опубликованными в собственных статьях:

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. [9]

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.[12]

4.1. 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. У 4% (4/104) пациентов ретроспективно были обнаружены по одной гетерозиготе при поиске частых мутаций, однако в связи с отсутствием биологического материала из дальнейшего анализа эти дети были исключены.

БВК протекала у 89% детей в абдоминальной форме, у 11% - в смешанной форме. Большинство пациентов проживали в Центральном федеральном округе 27% (27/100), в Южном федеральном округе - 20% (20/100), в Сибирском федеральном округе – 10% (10/100), в Приволжском федеральном округе 12% (12/100), в Северно-Кавказском федеральном округе - 8% (8/100), в Уральском федеральном округе 15% (15/100), в Северно-Западном федеральном округе - 5% (5/100), в Дальневосточном федеральном округе проживало 3% (3/100) пациентов.

Географическое распределение пациентов с БВК в зависимости от региона проживания отображено на рисунке 14.

По результатам молекулярно-генетического исследования всего был выявлен 51 вариант в гене *ATP7B* (таблица 8).

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, аллельная частота составила 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 аллельными 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): *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* (таблица 9).

Все варианты были подтверждены с помощью двунаправленного секвенирования по Сэнгеру, а их транс-положение – с помощью семейного сегрегационного анализа.

Анализ распределения мутаций по типу показал превалирование миссенс вариантов – аллельная частота 67%. Аллельная частота мутаций со сдвигом рамки считывания составила 20,5%, мутации, приводящие к нарушению сайта сплайсинга встречались в 7,2% случаев, наиболее редкими были нонсенс-мутации – 4% и делеции без сдвига рамки считывания -1%.



Рисунок 14. Географическое распределение пациентов с БВК в зависимости от региона проживания.

Таблица 8. Спектр и аллельные частоты вариантов гена *ATP7B*, выявленных при обследовании российских детей с БВК.

Экзон	Нуклеотидный вариант	Аминокислотный вариант	Тип мутации	Частота минорного аллеля в исследуемой когорте*, абс (%)	Частота минорного аллеля, gnomAD v.4.1.0
14	*c.3207C>A*	*p.(His1069Gln)*	Миссенс	91 (45,5%)	0,09
15	*c.3402del*	*p.(Ala1135Glnfs*13)*	Делеция со сдвигом рамки считывания	13 (6,5%)	0,004
14	*c.3190G>A*	*p.(Glu1064Lys)*	Миссенс	12 (6%)	0,0002
8	*c.2304insC*	*p.(Met769Hisfs*26)*	Инсерция со сдвигом рамки считывания	11(5,5%)	0,01
13	*c.3036dup*	*p.(Lys1013Glnfs*15)*	Делеция со сдвигом рамки считывания	10 (5%)	0,0001
16	*c.3556+1G>T*	-	Нарушение сплайсинга	5 (2,5%)	0,00006
2	*c.347T>C*	*p.(Ile116Thr)*	Миссенс	3 (1,5%)	0,01
16	***c.3459G>A***	***p.(Trp1153*)***	Нонсенс	3 (1,5%)	нет данных
7	*c.2071G>A*	*p.(Gly691Arg)*	Миссенс	2 (1%)	0,0001
8	*c.2128G>A*	*p.(Gly710Ser)*	Миссенс	2 (1%)	0,003
16	***c.3533C>G***	***p.(Thr1178Arg)***	Миссенс	2 (1%)	нет данных
13	*c.2998G>A*	*p.(Gly1000Arg)*	Миссенс	2 (1%)	0,002
7	*c.2121+3A>G*	-	Нарушение сплайсинга	2 (1%)	0,0004
19	***c.3942_3945del***	***p.(Lys1315Glyfs*14)***	Делеция со сдвигом рамки считывания	2 (1%)	нет данных
16	*c.3472_3482del*	*p.(Gly1158Phefs*2)*	Делеция со сдвигом рамки считывания	2 (1%)	0,0004

Продолжение **таблицы 8.**

8	*c.2293G>A*	*(p.Asp765Asn)*	Миссенс	2 (1%)	0,0009
8	*c.2292C>T*	*p.(Phe764=)*	Нарушение сплайсинга	2 (1%)	0,0009
10	***c.2528G>A***	***p.(Gly843Glu)***	Миссенс	1 (0,5%)	нет данных
7	*c.2078C>G*	*p.(Ser693Cys)*	Миссенс	1 (0,5%)	0,00006
21	*c.4301C>T*	*p.(Thr1434Met)*	Миссенс	1 (0,5%)	0,1
12	*c.2755C>T*	*p.(Arg919Trp)*	Миссенс	1 (0,5%)	0,003
20	*c.4022G>T*	*p.(Gly1341Val)*	Миссенс	1 (0,5%)	нет данных
20	*c.4022G>A*	*p.(Gly1341Asp)*	Миссенс	1 (0,5%)	0,0006
19	*c.3955C>T*	*p.(Arg1319*)*	Нонсенс	1 (0,5%)	0,01
6	***c.1945C>T***	***p.(Gln649*)***	Нонсенс	1 (0,5%)	0,0002
15	***c.3412+1G>A***	-	Нарушение сплайсинга	1 (0,5%)	нет данных
21	*c.4125-2A>G*	-	Нарушение сплайсинга	1 (0,5%)	нет данных
6	*c.1870-8A>G*	-	Нарушение сплайсинга	1 (0,5%)	нет данных
4	***c.1707+2dup***	**-**	Нарушение сплайсинга	1 (0,5%)	0,0003
18	*c.3809A>G*	*(p.Asn1270Ser)*	Миссенс	1 (0,5%)	0,01
4	*c.1630C>T*	*p.(Gln544*)*	Нонсенс	1 (0,5%)	0,002
8	*c.2333G>A*	*p.(Arg778Gln)*	Миссенс	1 (0,5%)	0,001
8	*c.2335T>G*	*p.(Trp779Glu)*	Миссенс	1 (0,5%)	0,0001
2	*c.213_214del*	*p.(Val73Glufs*4)*	Делеция со сдвигом рамки считывания	1 (0,5%)	0,00006
13	***c.3002T>G***	***p.(Val1001Gly)***	Миссенс	1 (0,5%)	нет данных

Продолжение **таблицы 8.**

8	*c.2279C>T*	*(p.Pro760Leu)*	Миссенс	1 (0,5%)	0,00006
19	*c.3942_3943del*	*p.(Lys1315Glufs*17)*	Делеция со сдвигом рамки считывания	1 (0,5%)	0,00006
17	*c.3649_3654del*	*p.(Val1217_Leu1218del)*	Делеция без сдвига рамки считывания	1 (0,5%)	0,002
19	*c.3948del*	*p.(Thr1317Leufs*13)*	Делеция со сдвигом рамки считывания	1 (0,5%)	0,00006
7	***c.1964T>C***	***p.(Leu655Pro)***	Миссенс	1 (0,5%)	0,0001
19	*c.4021G>A*	*p.(Gly1341Ser)*	Миссенс	1 (0,5%)	0,00006
2	*c.254G>T*	*p.(Gly85Val)*	Миссенс	1 (0,5%)	0,00006
2	***c.1285+1G>A***	**-**	Нарушение сплайсинга	1 (0,5%)	0,00006
16	*c.3548C>G*	*p.(Ala1183Gly)*	Миссенс	1 (0,5%)	нет данных
3	***c.1339C>T***	***p.(Gln447*)***	Нонсенс	1 (0,5%)	0,00006
17	*c.3646G>A*	*p.(Val1216Met)*	Миссенс	1 (0,5%)	0,003
13	***c.2866-14T>A***	**-**	Нарушение сплайсинга	1 (0,5%)	нет данных
2	*c.331C>T*	*p.(Gln111*)*	Нонсенс	1 (0,5%)	0,001
12	***c.2815T>A***	***p.(Trp939Arg)***	Миссенс	1 (0,5%)	нет данных
1	***c.1_51del***	***p.M1_K17del***	Делеция без сдвига рамки считывания	1 (0,5%)	нет данных
8	*c.2305A>G*	*p.(Met769Val)*	Миссенс	1 (0,5%)	0,03
Примечание: * - частота рассчитана для 200 секвенированных аллелей. Жирным шрифтом выделены варианты гена *ATP7B*, ранее не описанные в литературе.					

Таблица 9. 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 (MPS) [20]	

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.

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 ним, значительное число различных вариантов выявлено в экзонах 2, 16 и 19 (по 9,8%; 5/51 на каждый экзон) (рисунок 15).



Рисунок 15. Распределение числа выявленных аллелей и числа уникальных вариантов в различных экзонах гена *ATP7B* у российских детей с БВК.

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* [60]. 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*.

Поскольку для педиатрических пациентов набор 3 баллов, согласно балльной шкале, является трудной задачей, расчетная выявляемость вариантов различных

генетических методов диагностики основывалась на обнаружении биаллельных вариантов, результаты представлены в таблице 10.

Таблица 10. 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%
Секвенирования по Сэнгеру 8,13-16 экзонов	67%
ВПС	99%

Наименее эффективными по расчетной выявляемости были методы, направленные 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%.

Рассчитана себестоимость трёх методов молекулярно-генетической диагностики: панели «12 частых мутаций» методом ПЦР в режиме реального времени, таргетного секвенирования экзонов 8, 13–16 гена *ATP7B* по Сэнгеру и ВПС с анализом всех кодирующих и прилегающих интронных областей гена. Себестоимость ПЦР-панели «12 частых мутаций» вычислена как средняя

стоимость на основании цены за исследование в генетических лабораториях и составила 11 886,67 рубля. Для исследования экзонов 8, 13–16 гена методом прямого секвенирования по Сэнгеру и для ВПС использовалась себестоимость, вычисленная в медико-генетическом центре ФГАУ «НМИЦ здоровья детей», которая составила 9 554,17 рубля и 15 775 рублей соответственно.

Проведённый анализ показал, что наиболее экономически выгодной стратегией молекулярно-генетической диагностики БВК у детей является двухэтапный алгоритм: первый этап – таргетное исследование экзонов 8, 13–16 и прилегающих интронных областей гена *ATP7B* методом прямого секвенирования по Сэнгеру; при отрицательном результате – второй этап – ВПС всех кодирующих и прилегающих интронных областей гена *ATP7B*.

Расчётная себестоимость диагностики 100 образцов, протипироанных нами, с учётом выявляемости для данного алгоритма составила 1 160 693 рубля, что на 26,4% ниже, чем при использовании только ВПС, и на 18,6% ниже, чем при применении на первом этапе ПЦР-панели «12 частых мутаций» (таблица 11).

Таблица 11. Расчетная себестоимость различных алгоритмов молекулярно-генетической диагностики 100 образцов, протипированных нами.

Алгоритм молекулярно-генетической диагностики	Себестоимость с учетом расчетной выявляемости, руб.
Секвенирование по Сэнгеру 8,13-16 экзонов ⟶ ВПС	1 160 693
12 частых мутаций методом ПЦР ⟶ ВПС	1 425 855
ВПС	1 577 500

Использование ВПС в качестве метода первого уровня экономически оправдано в крупных специализированных центрах с устойчивым потоком пациентов не только с БВК, но и подозрением на другие наследственные заболевания. Формирование пулов образцов для мультиплексного анализа позволяет оптимизировать загрузку оборудования и снизить удельную себестоимость исследования в расчёте на одного пациента. При большом количестве образцов ВПС может использоваться как самостоятельный метод

первого этапа без значительного удорожания, однако двухэтапный подход остаётся предпочтительным при смешанном потоке пациентов с подозрением на различные наследственные болезни, либо при незначительном числе анализируемых образцов, как в нашем исследовании.

4.2. 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 [67], 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 12).

Таблица 12. 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 13).

Таблица 13. 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) (рисунок 16).

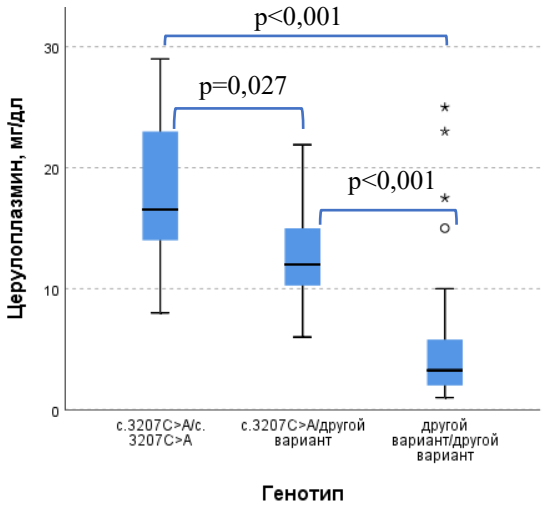


Рисунок 16. Значения церулоплазмина у пациентов с различным генотипом, определяющимся наличием либо отсутствием мажорного варианта.

В то же время достоверных различий между аналогичными группами в уровне суточной экскреции меди с мочой не было выявлено (p=0,129), что может говорить о зависимости данного параметра от других факторов.

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) (таблица 14).

Таблица 14. Распределение пациентов по генотипам и возрасту дебюта БВК.

Группы пациентов в зависимости от генотипа	n	Возраст манифестации абс., (%)			
		До 5 лет	5 – 10 лет	10-15 лет	Старше 15 лет
Г1	55	21 (38,2)	20 (36,4)	13 (23,6)	1 (1,8)
Г2	49	11 (15,1)	25 (51,0)	6 (12,2)	7 (14,3)

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) (рисунок 17). Различий в уровнях суточной экскреции меди с мочой не было обнаружено (p=0,195).

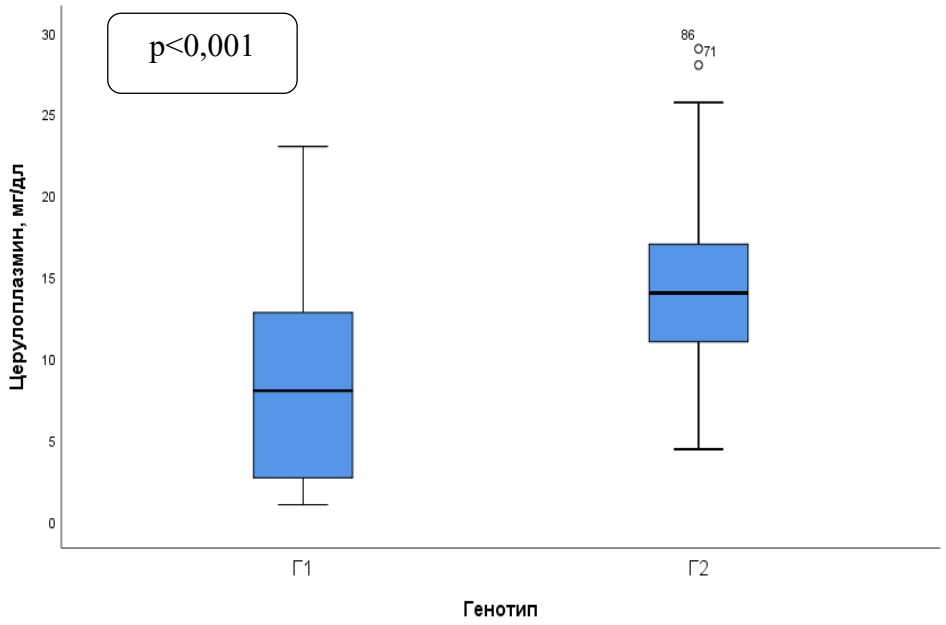


Рисунок 17. Значения церулоплазмина у пациентов с различным генотипом, определяющимся наличием либо отсутствием варианта, приводящего к укорочению кодируемого белка.

При оценке внутрисемейной вариабельности фенотипов у 6 пар сибсов, нами не было установлено достоверных различий в фенотипе заболеваний, который был представлен абдоминальной формой у всех пациентов (таблица 15).

Таблица 15. Клинический фенотип и патогенные варианты в гене *ATP7B* у 12 братьев и сестер с БВК в 6 семьях.

Семьи	Сибсы	Пол	Возраст дебюта БВК (лет)	Возраст постановки БВК (лет)	Вариант 1	Вариант 2	Фенотип БВК
1	1 2	М Д	6,8 5,6	9,2 5,6	*c.2304insC* *c.2304insC*	*c.3556+1G>T* *c.3556+1G>T*	Гепатит Гепатит
2	1 2	М Д	5,5 1	6,4 1,2	*c.3207C>A* *c.3207C>A*	*c.3207C>A* *c.3207C>A*	Гепатит Гепатит
3	1 2	Д М	3,5 2,8	4 2,9	*c.3207C>A* *c.3207C>A*	*c.3459G>A* *c.3459G>A*	Гепатит Гепатит
4	1 2*	Д М	10,3 3,3	10,3 5,9	*c.3207C>A* *c.3207C>A*	*c.2304insC* *c.2304insC*	Гепатит Гепатит
5	1 2*	Д Д	5,4 3	6,1 3,8	*c.3190G>A* *c.3190G>A*	*c.3036insC* *c.3036insC*	Гепатит Гепатит
6	1 2	М М	4,8 5	10,2 6,3	*c.3207C>A* *c.3207C>A*	*c.3402del* *c.3402del*	Гепатит Гепатит

Таким образом, определен и охарактеризован спектр вариантов гена ATP7B в российской педиатрической когорте пациентов, включающий 51 вариант, из которых 14 ранее не были описаны в литературе. Предложен и обоснован алгоритм молекулярно-генетической диагностики: на первом этапе выполняется секвенирование по Сэнгеру экзонов 8, 13–16 гена *ATP7B*; при отрицательном результате используется ВПС. В результате анализа генотип-фенотипических взаимосвязей установлено, что пациенты, имеющие в генотипе хотя бы на одном аллеле вариант, приводящий к укорочению кодируемого белка, отличались более ранним дебютом заболевания, низкими значениями церулоплазмина и более тяжелым поражением печени, что подтверждает определяющую роль характера молекулярного дефекта в формировании клинического фенотипа БВК.

Алгоритм диагностики

На основании полученных результатов предложен алгоритм диагностики БВК у детей (рисунок 18).

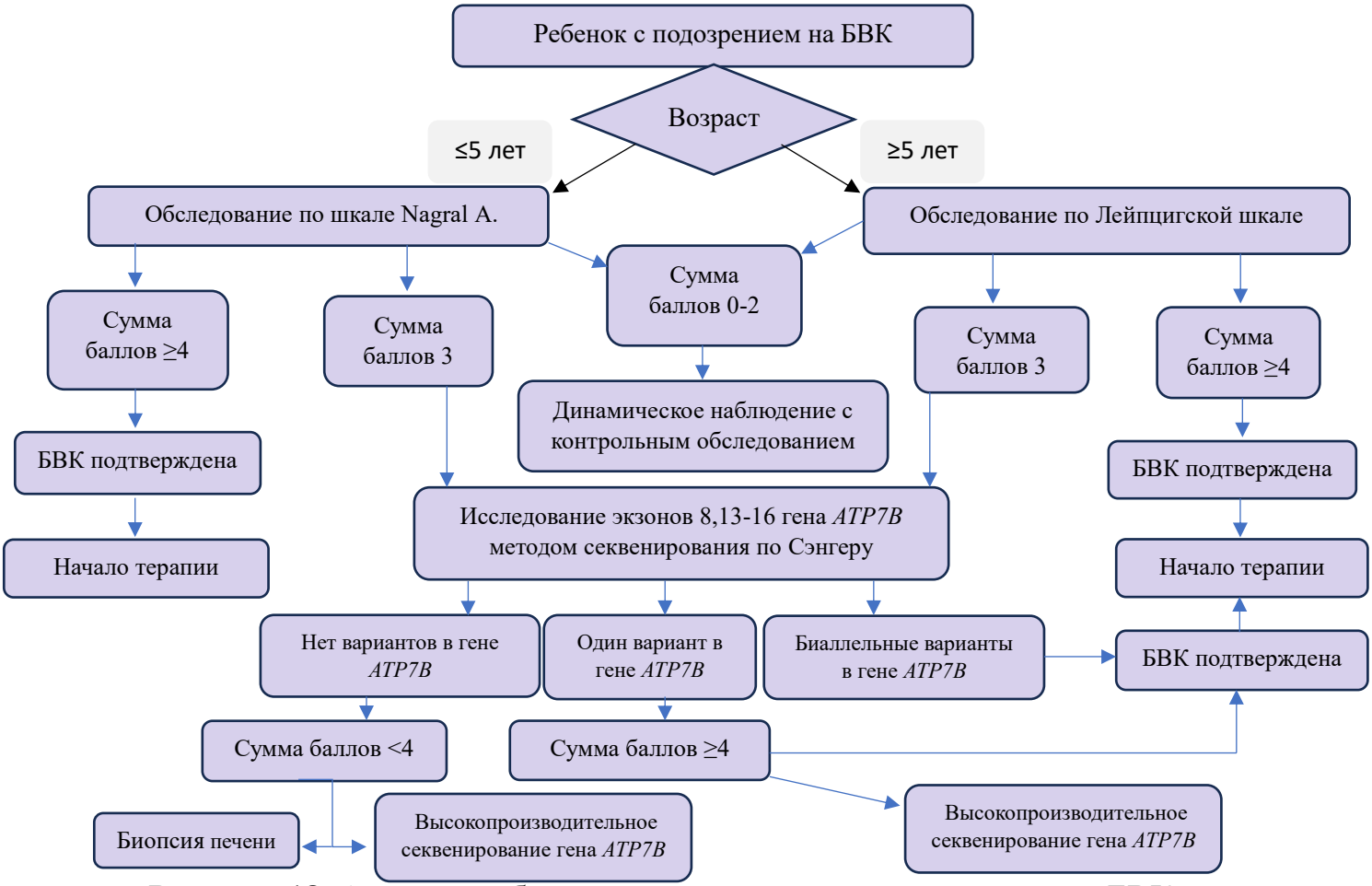


Рисунок 18. Алгоритм обследования пациента с подозрением на БВК.

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ №2

Мальчик, 8 лет.

Из анамнеза жизни известно, что ребенок от 1-й беременности, протекавшей без особенностей, от 1 срочных физиологических родов. Рос и развивался в соответствии с возрастом. Аллергологический и наследственный анамнез не отягощены.

В возрасте 8 лет при амбулаторном обследовании по месту жительства в биохимическом анализе крови впервые выявлено повышение АЛТ и АСТ до 3 норм, ЩФ до 500 Ед/л. Исключено течение вирусных гепатитов. При дополнительном обследовании обнаружено снижение церулоплазмина до 2,6 мг/дл, повышение суточной экскреции меди с мочой до 329 мкг/сут. МРТ органов брюшной полости: гепатомегалия, увеличение объема желчного пузыря. Установлен диагноз болезнь Вильсона-Коновалова, назначена терапия Д-пенициламмином. Проведено исследование образца ДНК методом ПЦР с целью поиска наиболее частых мутаций гена *ATP7B,* по результатам которого патогенных вариантов не обнаружено.

При поступлении в гастроэнтерологическое отделение ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России лабораторно сохранялись синдромы цитолиза (АЛТ 124 Ед/л, АСТ 63 Ед/л) и холестаза (ГГТ 46 Ед/л). Фиброэластометрия печени: фиброз нет (F0 по шкале METAVIR). Осмотрен офтальмологом – без патологии. МРТ головного мозга: данных за объемное/очаговое поражение вещества головного мозга не выявлено.

Проведен поиск патогенных вариантов в гене *ATP7B* методом ВПС, обнаружено 2 варианта в компаунд-гетерозиготном состоянии: в экзоне 8 *c.2292C>T* и в экзоне 13 *c.3002T>G*. При этом вариант *c.3002T>G* ранее не был описан в литературе.

Проведенный анализ наглядно демонстрирует диагностические преимущества таргетного секвенирования всех кодирующих и прилегающих интронных областей гена *ATP7B* методом ВПС над целевым поиском частых мутаций. В представленном клиническом наблюдении применение метода ПЦР с

целью поиска наиболее частых мутаций гена *ATP7B* не позволило верифицировать диагноз, тогда как использование метода ВПС дало возможность детектировать оба варианта, включая ранее не описанный в литературе вариант *c.3002T>G*, и подтвердить диагноз БВК. Полученные результаты подчеркивают целесообразность анализа всех кодирующих областей гена *ATP7B* при наличии убедительной клинико-лабораторной картины заболевания даже если при поиске частых мутаций получен отрицательный результат, что особенно актуально для генетически гетерогенных заболеваний с широким спектром патогенных вариантов.

Глава 5. СОДЕРЖАНИЕ МАРКЕРОВ ФИБРОЗИРОВАНИЯ В СЫВОРОТКЕ НА РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЯХ ФИБРОЗА ПРИ БВК И ИХ ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Раздел написан в соответствии с материалами, опубликованными в собственных статьях:

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.[11]

5.1. Взаимосвязь уровня сывороточных биомаркеров фиброзирования со стадией фиброза печени при БВК

В исследование включено 80 детей (59 мальчиков и 21 девочка) с диагнозом БВК в возрасте от 3 до 17 лет и 11 месяцев, Me – 12,45 [10,4; 14,97] лет, протекавшем в абдоминальной форме у 91,2% (73/80) пациентов и у 8,8% (7/80) - в смешанной форме. 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 19.

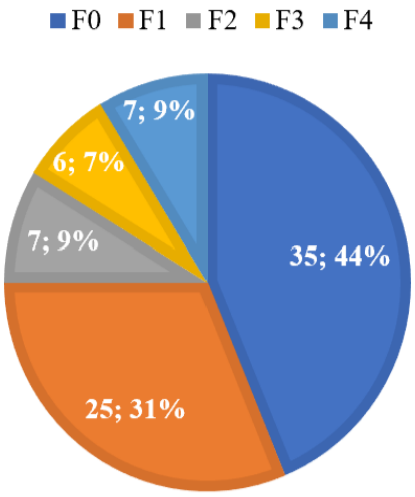


Рисунок 19. Распределение пациентов с БВК по стадиям фиброза печени.

Анализ концентраций непрямых маркеров фиброзирования при различных стадиях фиброза выявил более высокие значения АСТ (p=0,017), фракций билирубина (p<0,001), ГГТ (p=0,002) и низкие – альбумина, тромбоцитов и холестерина (p<0,001) при циррозе печени. В то время как различий для АЛТ, щелочной фосфатазы и триглицеридов выявлено не было (таблица 16).

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) (таблица 16).

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=0.530, p<0.001) (рисунок 20). Слабая, но статистически значимая прямая корреляция установлена между TGF-β и VEGF (r=0.299, p=0.02) (рисунок 21), в то время как с CTGF значимой взаимосвязи не выявлено.

Таблица 16. Уровень сывороточных маркеров фиброзирования, церулоплазмина и суточной экскреции меди в моче у пациентов с БВК при разных стадиях фиброза печени.

Параметры	Референсные значения	Степени фиброза печени					p
		F0 Me [IQR]	F1 Me [IQR]	F2 Me [IQR]	F3 Me [IQR]	F4 Me [IQR]	
АЛТ (Ед/л)	(0-40)	38 [17;84]	34.5 [21.7;71.2]	68 [32.5;229]	43.6 [17;203]	105 [51;162]	p=0.117
АСТ (Ед/л)	(0-40)	31.9 [23.3;57.7]	27.3 [22;54.8]	56 [31.4;101]	31.8 [20.4;90]	93.2 [63.4;104]	p=0.017* p1-4=0.002
ГГТ (Ед/л)	(5-35)	23 [17.7;37]	27 [17.6;39.9]	26 [17;59]	33.5 [19.2;65.0]	89.9 [61;12.6]	p=0.002* p0-4=0.001 p1-4=0.003
ЩФ (Ед/л)	(60-400)	317 [240;414]	282 [135;411]	192 [94;345]	188 [136;243]	314 [168;428]	p=0.08
Альбумин (г\л)	(38-54)	45 [42;47]	45 [43;48]	41 [41;48]	43 [40;44]	33 [29;45]	p<0.001* p0-4=0.001 p1-4<0.001
НБ (мкмоль/л)	(0-13)	2.3 [1.5;3.2]	2.8 [2.2;4.4]	3.7 [2.7;5.2]	3.0 [2.5;3.8]	23.4 [8.4;37.7]	p<0.001* p0-4<0.001 p2-4=0.016
ПБ (мкмоль/л)	(0-5.1)	8.3 [6.3;11.4]	10.1 [7.4;15.3]	9.3 [6.8;9.9]	11.4 [7.3;13]	26 [14.4;33.7]	p=0.001* p0-2=0.023 p0-4<0.001 p1-4<0.001 p3-4=0.002

Продолжение **таблицы 16.**

Холестерин (мкмоль/л)	(3.3-6.5)	4.8 [4.3;5.4]	4.6 [4.1;5.0]	4.5 [4.0;4.9]	4.0 [3.6;4.6]	3.2 [2.3;3.5]	p<0.001 p1-4=0.007 p2-4=0.015 p0-4<0.001
Триглицериды (мкмоль/л)	(0.34-1.6)	1.1 [0.7;1.5]	1.1 [0.8;1.5]	1.5 [1;1.8]	1.5 [0.9;1.6]	0.5 [0.4;0.8]	p=0.061
Церулоплазмин (мг/дл)	(20-54)	9 [1.5;15]	6 [2;9.7]	8 [6;12]	9.6 [2.1;11]	8.2 [6.2;12]	p=0.726
Тромбоциты (10^9/л)	(150-450)	358 [294;412]	316 [246;377]	280 [215;298]	252 [119;395]	64 [48;157]	p<0.001 p1-4=0.012 p0-4<0.001
Медь в моче (мкг/24часа)	(0-50)	252 [80.6;737]	481 [201;764]	594 [91;1807]	477[179;1065]	734 [215;875]	p=0.165
TGF-β (пг/мл)	(18 - 4000)	50620 [43230;59252]	53470 [42371;53470]	46908 [40586;58646]	39160 [28760;57162]	16608 [10608;22972]	p<0.001 p0-4<0.001 p1-4<0.001 p2-4=0.026
PDGF-BB (пг/мл)	(1 - 400)	14736 [12800.8;15712]	15017 [13045.6;17705.2]	13220 [12314.4;15729.6]	12992 [10354.4;15344.8]	10839 [4497.8;17368.8]	p=0.033 p1-4=0.047
CTGF (нг/мл)	(1.52 - 200)	73 [41.9;153]	59.9 [24.6;94.9]	29.3 [23.9;60.9]	25.9 [11;43.3]	11 [3.8;47.7]	p=0.001 p0-4=0.008 p0-3=0.033
VEGF (пг/мл)	(31.25-2000)	141.7 [79.3;262.7]	133.9 [56.7;311.6]	189.7 [45.6;261.3]	193.9 [36.3; 276.5]	73.6 [6.5; 147.7]	p=0.212
Примечание: в таблице представлены только достоверные различия между группами.							

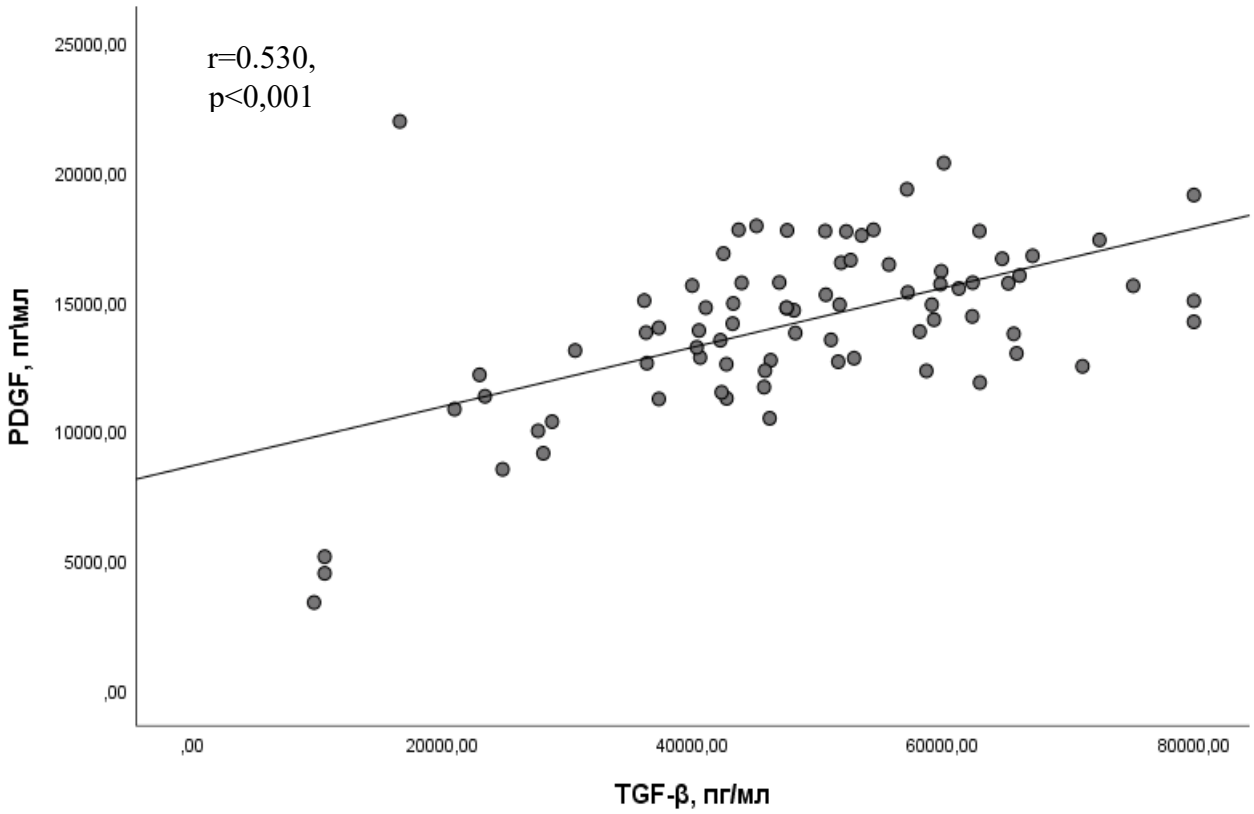


Рисунок 20. График корреляционного анализа взаимосвязи TGF-β с PDGF-BB.

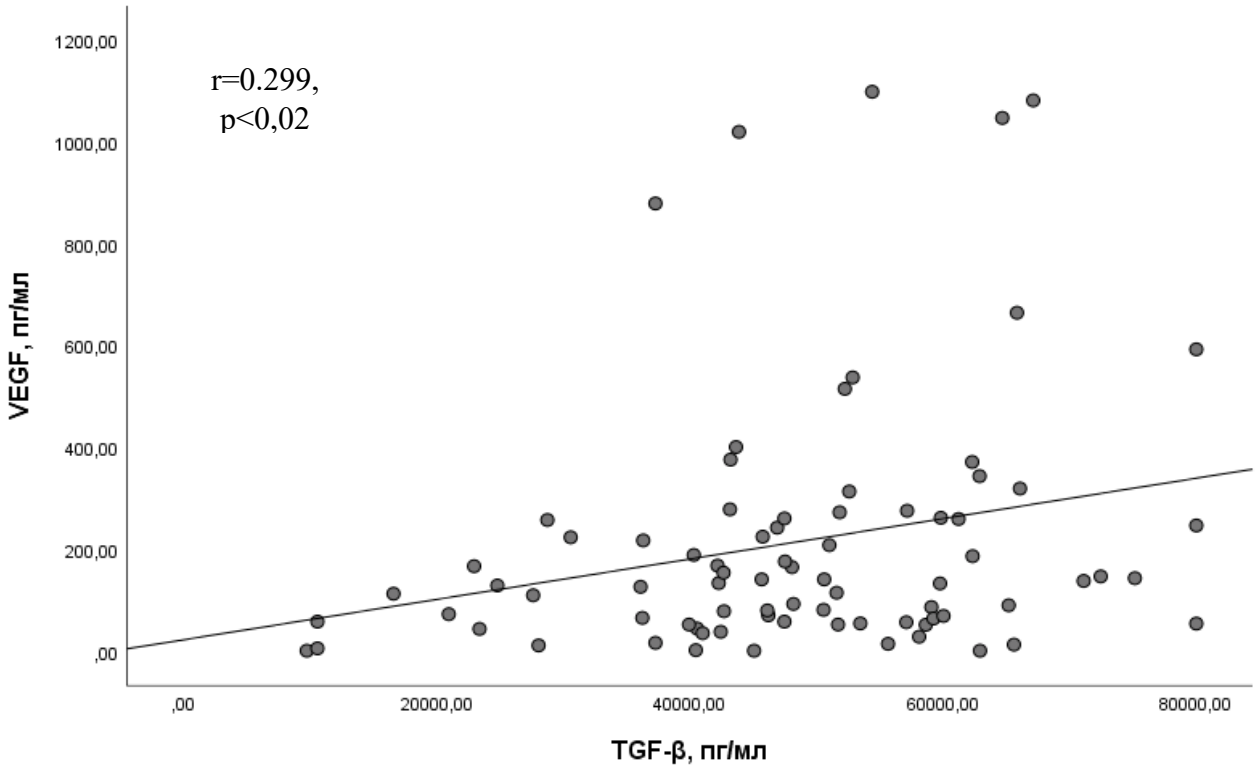


Рисунок 21. График корреляционного анализа взаимосвязи TGF-β с VEGF.

Выявлены сильные прямые корреляционные зависимости TGF-β с количеством тромбоцитов (r_{xy}=0,598, p<0,001) (рисунок 22), с концентрацией общего холестерина (r=0.516, p<0.001) (рисунок 23), умеренной силы прямая - с концентрацией триглицеридов (r=0.352, p<0.001) (рисунок 24), отрицательная корреляция умеренной силы с концентрацией прямого билирубина (r_{xy}= 0,452, p<0,001) (рисунок 25), а также слабой силы прямая корреляционная зависимость с концентрацией альбумина (r_{xy}=0,245, p=0,014).

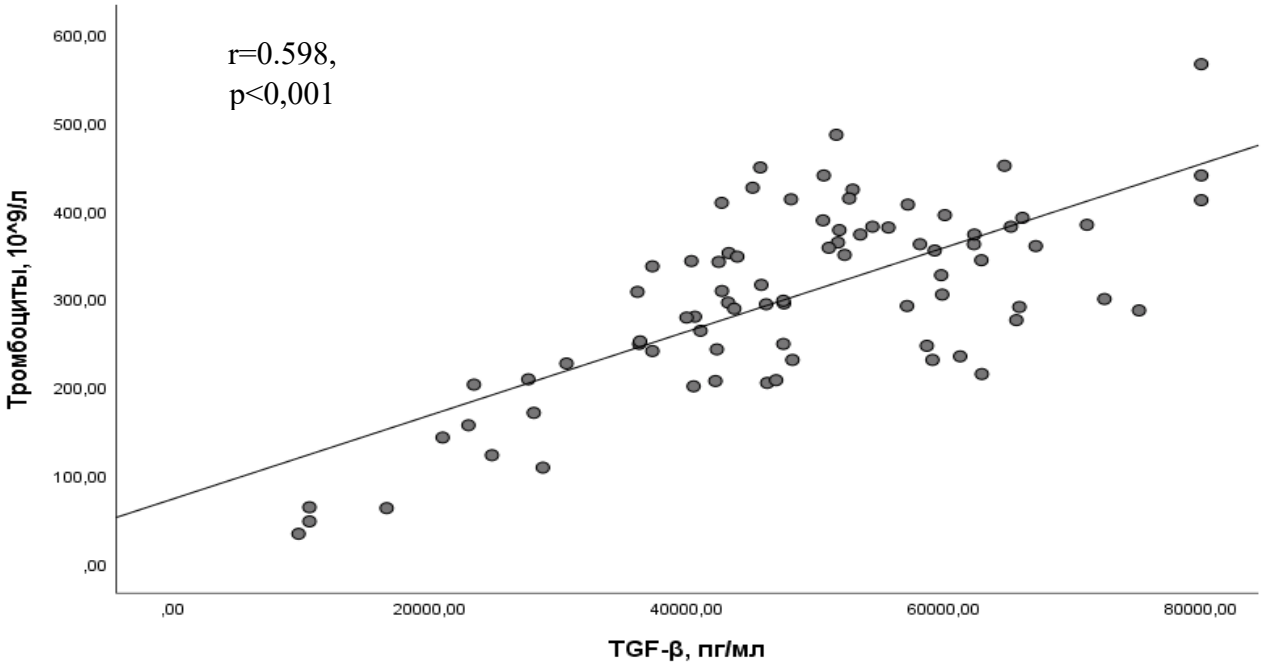


Рисунок 22. График корреляционного анализа взаимосвязи TGF-β с тромбоцитами.

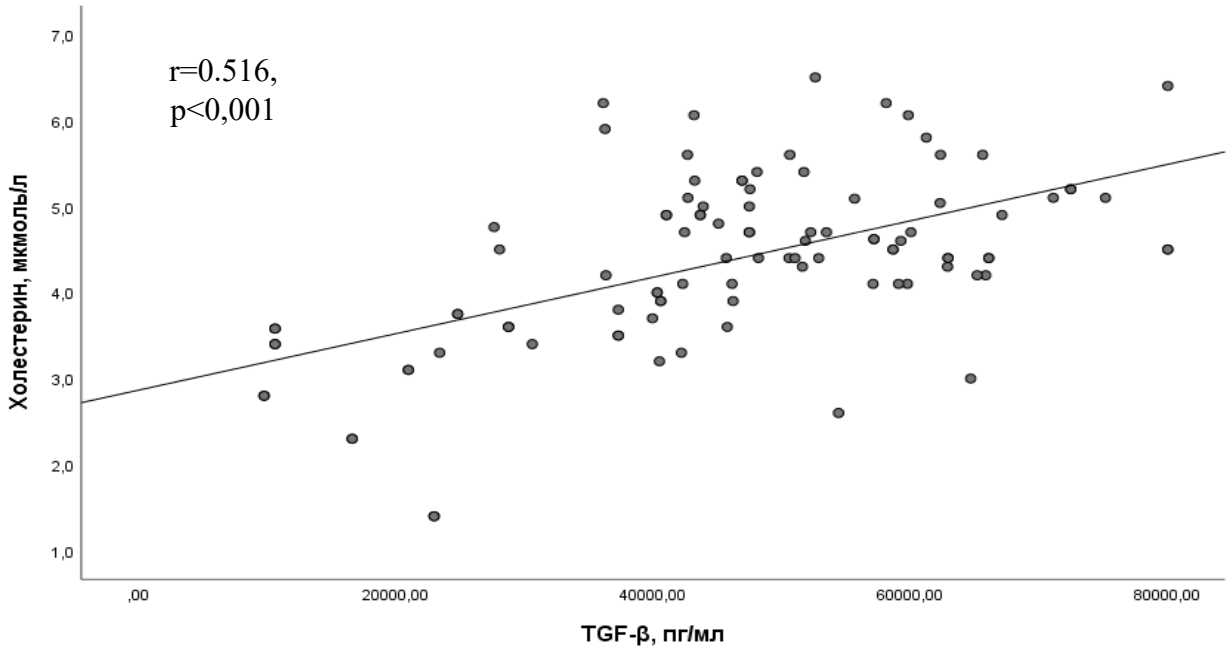


Рисунок 23. График корреляционного анализа взаимосвязи TGF-β с холестерином.

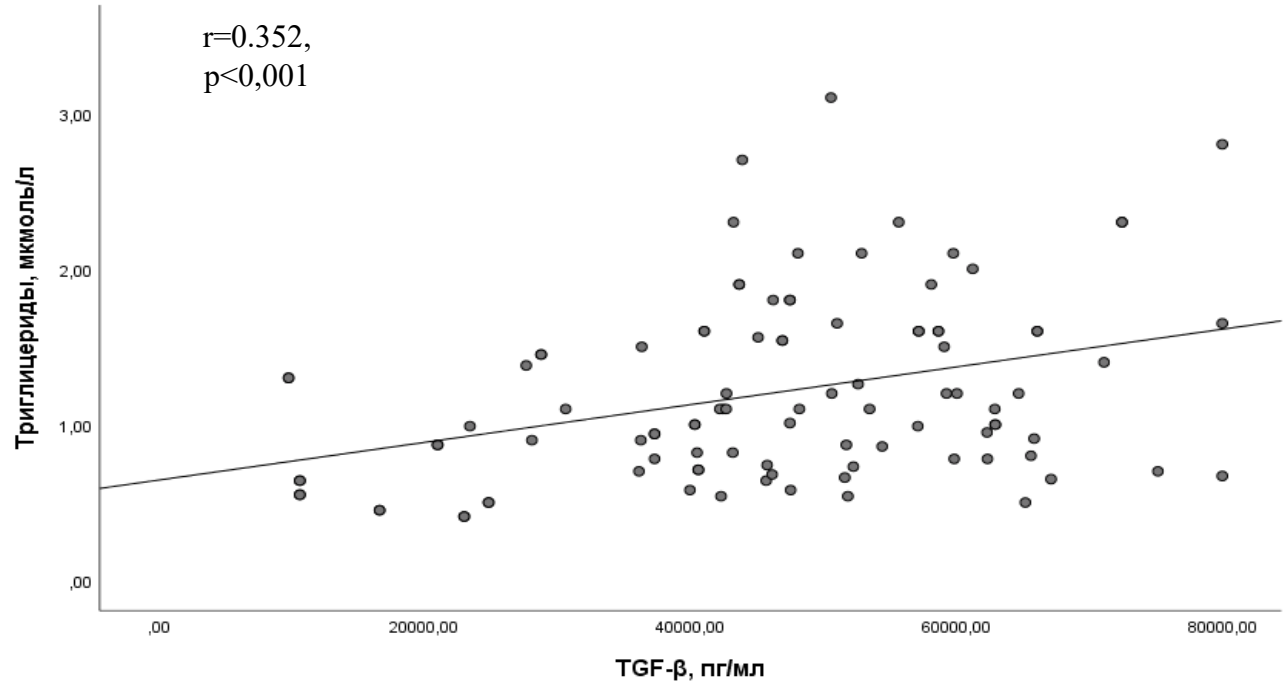


Рисунок 24. График корреляционного анализа взаимосвязи TGF-β с триглицеридами.

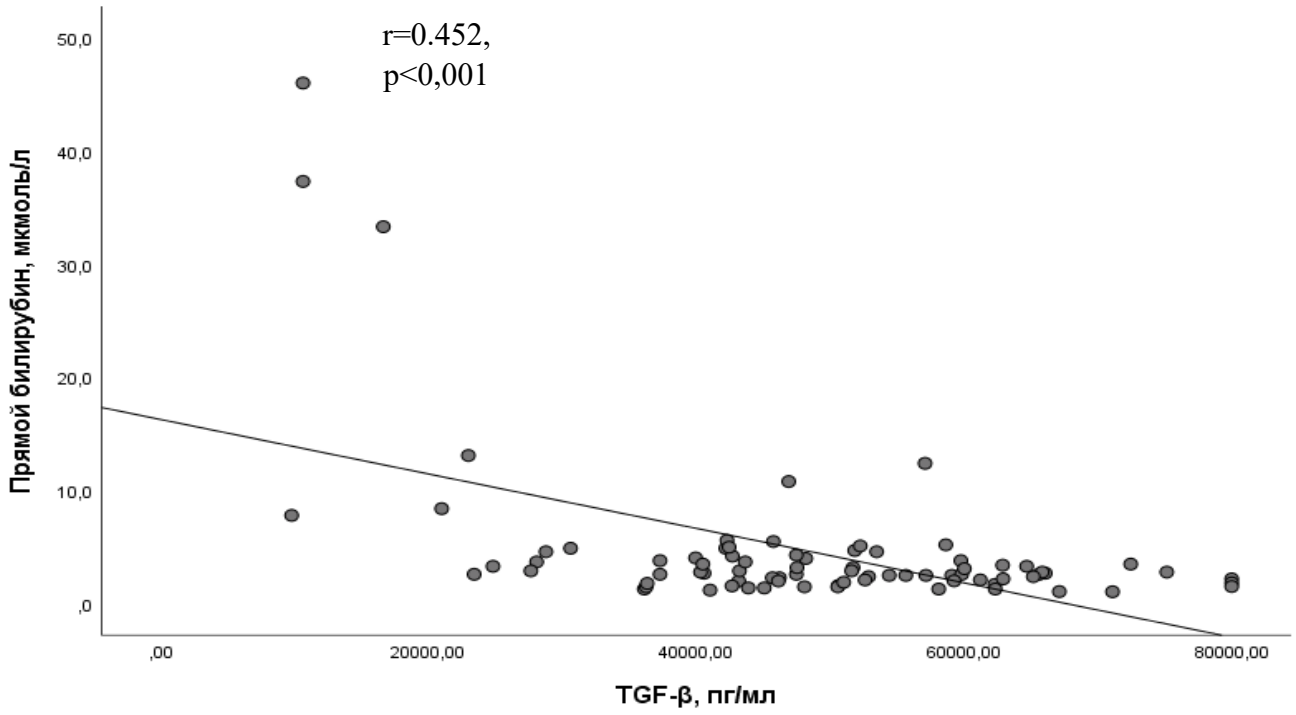


Рисунок 25. График корреляционного анализа взаимосвязи TGF-β прямым билирубином.

Для PDGF-BB установлены умеренные прямые корреляции с VEGF (r=0.393, p<0.001), АЛТ (r=0.359, p<0.001), ГГТ (r=0.311, p=0.002), холестерином (r=0.431, p<0.001) и тромбоцитами (r=0.478, p<0.001), а также слабые прямые корреляции с АСТ (r=0.277, p=0.005) и триглицеридами (r=0.268, p=0.007). Наиболее сильная прямая корреляция выявлена между PDGF-BB и альбумином (r=0.535, p<0.001), тогда как с прямым билирубином выявлена слабая обратная связь (r=-0.205, p=0.045).

Концентрация CTGF слабо коррелировала с альбумином (r=0.203, p=0.043) и щелочной фосфатазой (r=0.216, p=0.031). Обратные слабой силы корреляции выявлены между CTGF и прямым билирубином (r=-0.218, p=0.029) и умеренной силы (r=-0.353, p<0.001) с непрямым билирубином.

Выявлена слабая прямая корреляционная связь VEGF с церулоплазмином (r=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=0.278, p=0.006), PDGF-BB (r=0.223, p=0.028) и VEGF (r=0.265, p=0.009) с концентрацией меди в суточной моче.

5.2. Динамика маркеров фиброзирования на фоне терапии при БВК

Среди 80 пациентов у 17 детей измерения маркеров проводились в двух точках:

Группа 1 (n=9) – первая точка до значения терапии, вторая- через 12 месяцев после назначения купренила (Г1);

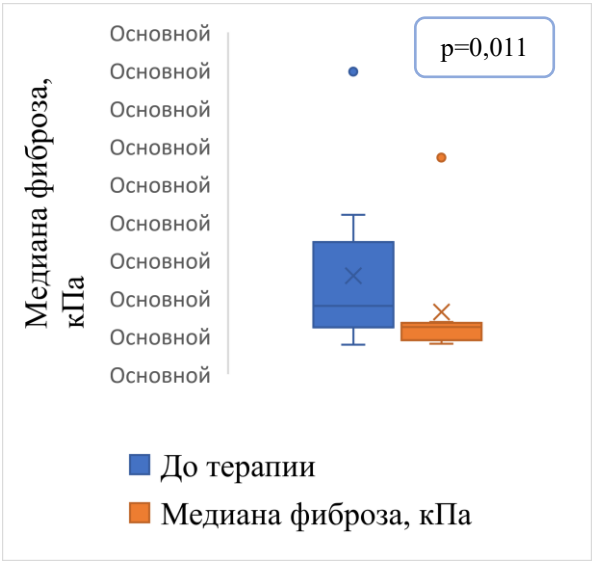
Группа 2 (n=7) – первая точка в период неэффективности терапии Д-пеницилламином, оцениваемой по суточной экскреции меди с мочой, вторая - через 12 месяцев после коррекции дозы Д-пеницилламина (Г2).

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 (рисунок 26А), АЛТ у 88,8% детей (p=0,021),

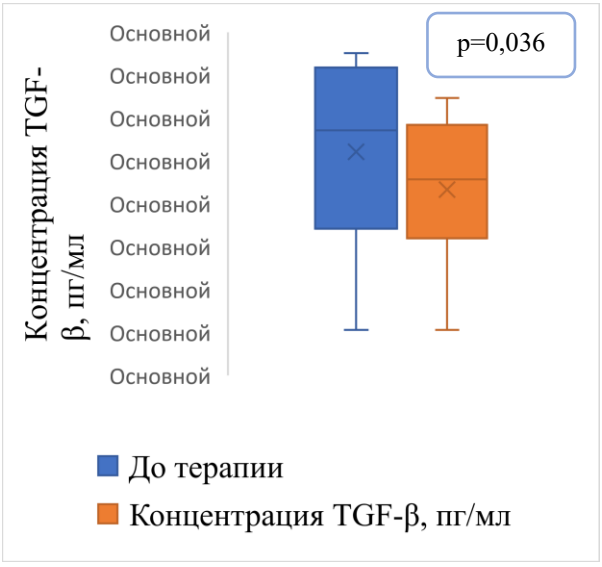
медианы – 94 [65,5;231] Ед/л и 39 [24,5;72] Ед/л, АСТ у 88,8% пациентов (p=0,015), медианы – 88 [57,5;105] Ед/л и 26 [22,5;48] Ед/л, ГГТ у 77,7% больных (p=0,038), медины 47 [38;89] Ед/л и 32 [20;46] Ед/л, TGF-β у 66,6% детей (p=0,036), медианы - 57162 [34223;71779] пг/мл и 45684 [31984;58430] пг/мл (рисунок 26Б), а также повышении 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) (рисунок 26В). Изменения уровней PDGF-BB и VEGF были статистически незначимы.

Во группе 2 ни для одного из исследуемых параметров не было выявлено статистически значимых изменений.

А



Б



В

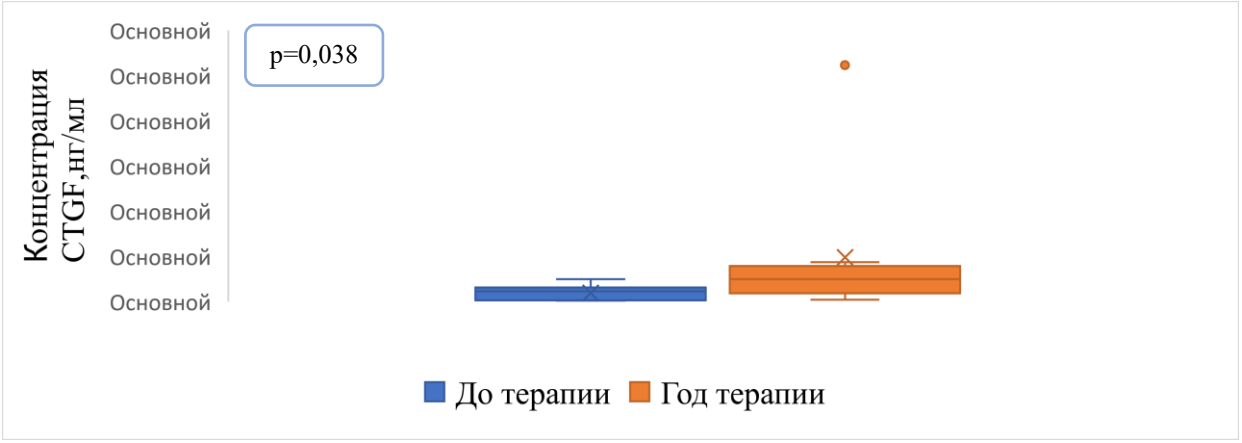


Рисунок 26: А – медиана фиброза до и через год терапии в Г1, Б – концентрация TGF-β до и через год терапии в Г1, В – концентрация CTGF до и через год терапии в Г1.

Таким образом, проведенное исследование позволило выявить динамику профибротических цитокинов (TGF-β, PDGF-BB, CTGF) при БВК с повышением их концентрации на ранних стадиях фиброза и последующим снижением при циррозе, что отражает истощение синтетической функции печени. Установленные закономерности согласуются с данными при других хронических заболеваниях печени, подтверждая универсальность механизмов фиброгенеза. Выявленная корреляция уровней факторов роста с суточной экскрецией меди с мочой свидетельствует об их участии в патогенетическом каскаде, индуцированном токсическим действием меди. Выявлен маркер (TGF-β), который может быть рассмотрен для мониторинга эффективности терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

БВК представляет собой редкое наследственное заболевание обмена меди, обусловленное патогенными вариантами гена *ATP7B*, кодирующего медь-транспортирующую АТФазу. Нарушение её функции приводит к избыточному накоплению меди в печени, головном мозге и других органах, что вызывает прогрессирующее повреждение тканей с формированием необратимых состояний и раннюю инвалидизацию пациентов [50, 56].

Особенностью БВК является длительное латентное течение и вариабельность фенотипических проявлений. В педиатрической практике данная проблема усугубляется ограниченным спектром и степенью выраженности клинических проявлений. Низкая диагностическая чувствительность рутинных лабораторных показателей обмена меди, особенно на доклинических стадиях, а также ограничения проведения биопсии печени ввиду инвазивности и методологической сложности формируют комплекс диагностических препятствий, результатом которых становятся ложноотрицательная диагностика и последующие тактические ошибки в лечении.

В связи с этим в последние годы наблюдается значительный рост роли молекулярно-генетической диагностики, которая обеспечивает не только достоверную верификацию заболевания, но и позволяет охарактеризовать мутационный профиль в различных популяциях, создавая основу для разработки регионально адаптированных диагностических панелей и закладывая фундамент для исследования генотип-фенотипических взаимосвязей.

Молекулярно-генетическая диагностика БВК прошла значительный путь развития, трансформируясь из узконаправленного поиска в комплексный анализ. Изначальная стратегия, обусловленная экономическими соображениями, была сосредоточена на выявлении ограниченного спектра частых мутаций, характерных для конкретных популяций. Для пациентов европейского происхождения, таким ключевым вариантом долгое время являлась мутация *c.3207C>A*. В Российской практике перечень «частых мутаций» последовательно расширялся — от 2 до 12 наиболее распространенных патогенных вариантов в гене *ATP7B*. Несмотря на

свою доступность, информативность этого подхода оказалась ограниченной в связи со значительным генетическим разнообразием БВК и частотой выявления вариантов в компаунд-гетерозиготных состояниях.

Качественный скачок в диагностике произошел с внедрением в клиническую практику технологии ВПС. Этот метод позволил преодолеть финансовые и методические барьеры, сделав секвенирование всех кодирующих и прилегающих интронных областей гена *ATP7B* доступным инструментом. Однако и у этого передового метода существуют свои ограничения, главные из которых — неспособность надежно детектировать протяженные делеции и дупликации, что указывает на необходимость включения различных методов молекулярно-генетического исследования в существующие алгоритмы диагностики БВК.

Наряду с ранней диагностикой важным прогностическим фактором течения БВК является фиброз печени. В современной гепатологии наблюдается закономерная тенденция к переходу от инвазивной биопсии печени к комплексному использованию неинвазивных методов диагностики фиброза. Несмотря на статус «золотого стандарта», биопсия характеризуется ограниченной репрезентативностью и риском осложнений, что особенно значимо в педиатрической практике. В свою очередь, неинвазивные методики, демонстрируя сопоставимую с морфологическим исследованием точность, экономическую эффективность и возможность динамического наблюдения, открывают новые перспективы не только для диагностики, но и для разработки антифибротической терапии.

Таким образом, целью нашего исследования было определение значения клинических проявлений, молекулярно-генетического тестирования и маркеров фиброзирования в диагносте болезни Вильсона-Коновалова у российских детей.

Для решения поставленных задач нами было обследовано 193 ребенка из них 104 пациента с БВК, среди них 68% (71/104) мальчиков и 32% (33/104) девочек, минимальный возраст – 3 года, максимальный – 17 лет и 11 месяцев, и 89 пациентов с гепатитами другой этиологии. В ретроспективную часть исследования включено 54 ребенка в возрасте от 3 лет до 17 лет 11 месяцев с диагнозом БВК, установленном

на основании клинической картины, результатов лабораторно-инструментальных методов исследования в соответствии с клиническими рекомендациями «БВК» [144].

В проспективную часть исследования включено 49 детей в возрасте от 3 лет до 17 лет 11 месяцев, которым для окончательной верификации диагноза было проведено молекулярно-генетическое исследование, и 80 пациентов с уже установленным диагнозом БВК в возрасте от 3 лет до 17 лет 11 месяцев, из них 17 детей были обследованы в динамике.

В ретроспективной части были проанализированы данные клинико-лабораторного и инструментального обследования пациентов с БВК и проведена оценка диагностической информативности методов, включенных в Лейпцигскую шкалу, а также информативность двух шкал диагностики.

В проспективной части исследования проведено молекулярно-генетическое исследование с целью поиска вариантов в гене *ATP7B* и определено содержание маркеров фибриогенеза (TGF-β, PDGF, CTGF, VEGF) в сыворотке крови при различных стадиях фиброза печени при БВК и их диагностические значение.

Современные достижения в диагностике, включая широкое внедрение в клиническую практику молекулярно-генетических методов, наряду с ростом профессиональной осведомленности врачей, привели к существенному «омоложению» орфанных заболеваний, в том числе БВК.

В сравнении с данными российского исследования от 2011 г. возраст манифестации заболевания и его диагностики сократились на 3 года, а длительность периода медицинского наблюдения до постановки диагноза с 3 лет до 10 месяцев [21]. Данный прорыв во многом повлиял на фенотип заболевания у детей, ограничив его бессимптомным повышением трансаминаз и изменениями размеров и структуры печени, что подтверждается сравнительным анализом частоты диагностики смешанной формы БВК, которая на момент исследования Четкиной Т.С. обнаружена в 21,8% случаев (22/101 детей), тогда как по нашим данным частота была в 2 раза меньше и составила 10,5% (11/104 детей), а также более низкой частотой выявления цирроза печени (43,6% против 10,5%).

Полученные различия могут объясняться более поздней диагностикой, длительностью периода до постановки диагноза и, соответственно, более поздним началом терапии.

В исследованной нами когорте преобладали пациенты с абдоминальной формой БВК (88,5%), что согласуется с данными мировых исследований о превалировании печеночных проявлений у детей [38, 50, 56, 120]. Около 5-15% детей с абдоминальной формой имеют признаки поражения нервной системы у детей, самый ранний возраст их манифестации 6 лет [38, 44]. По нашим данным неврологическая симптоматика была зарегистрирована у 6% детей, а у 6% – инструментальные признаки поражения головного мозга. Стоит отметить, что дети в данной группе были значимо старше (12,9 [5,5;17,8] лет) пациентов с абдоминальной формой (p=0,03), что согласуется с результатами исследования Garcı́a-Villarreal L. и соавт. и Ferenci P. и соавт. [55, 61].

Ранняя диагностика заболевания является одним из основных факторов, предотвращающих формирование неврологических осложнений, а в качестве маркера их возможного развития могут стать кольца Кайзера-Флейшера, которые по литературным данным чаще встречаются у пациентов с неврологическими проявлениями [2, 50]. В нашем исследовании шансы их обнаружения у детей с поражением нервной системы увеличивались в 5,3 раза. Еще одним проявлением БВК является Кумбс-негативная гемолитическая анемия, которая часто сопровождает острую печеночную недостаточность [63], однако ни у одного из исследуемых пациентов данного состояния зарегистрировано не было.

Отсутствие классических клинических симптомов у детей затрудняет диагностику БВК и ее дифференциацию с гепатитами другой этиологии. Согласно общепринятой Лейпцигской диагностической шкале, при отсутствии изменений со стороны нервной системы, колец Кайзера-Флейшера и Кумбс-негативной гемолитической анемии, дальнейшее обследование на БВК требует исключительно лабораторного выявления нарушений медного обмена, в том числе генетической диагностики и проведения биопсии печени.

Ключевой проблемой, выявленной в исследовании, является выраженная зависимость стандартных лабораторных маркеров БВК от возраста пациентов на момент ее диагностики. Так, медиана суточной экскреции меди у детей до 5 лет составила всего 54 мкг/сут, что значительно ниже общепринятого диагностического порога в 100 мкг/сут, в то время как у подростков старше 15 лет медиана экскреции достигала 194 мкг/сут. Эти данные согласуются с работой Ferenci P. и соавт. [55], которые отмечали постепенное накопление меди в организме при БВК, что объясняет более низкие показатели экскреции у детей младшего возраста, а также с исследованиями Dong Y. и соавт., которые установили что суточный уровень экскреции меди с мочой 40 мкг/сут чаще встречался у пациентов младше 14 лет (выборка включала 715 пациентов, средний возраст 18,8 лет) [46], и Garcı́a-Villarreal L. и соавт. по данным анализа которых (70 пациентов в возрасте от 1,5 до 67 лет) уровень экскреции меди с мочой коррелировал с возрастом манифестации заболевания ($r = 0,4$; $p < 0,05$) [61]. По нашим данным также установлена прямая умеренная корреляционная связь между уровнем меди в моче и возрастом пациентов на момент диагностики БВК ($r_{xy}= 0,315$, $p= 0,002$).

В тоже время в работе, включавшей 66 детей с БВК в возрасте 2-18 лет, подобных корреляций не было обнаружено, что вероятно связано с неравномерной выборкой пациентов из различных возрастных групп, которая в исследовании не представлена [22].

По результатам исследования Lu X. и соавт., включавшем 24 пациента с БВК и 68 пациентов без БВК, медиана суточной экскреции меди с мочой составляла 98,5 мкг/сут и 25 мкг/сут соответственно. Пороговое значение уровня суточной мочи (более 100 мг/24часа), используемое в Лейпцигской шкале, обладало 50% чувствительностью и 97% специфичностью, а значение 52 мкг/сут 84,6% и 91,2% соответственно [84].

По данным исследования Nicastro E. и соавт., проведенным на педиатрической выборке пациентов (40 детей с БВК и 58 пациентов с заболеваниями печени, отличными от БВК), базальный уровень суточной экскреции меди с мочой был значительно выше у пациентов с БВК (138,9 ± 15,1

мкг/сут) по сравнению с контрольной группой (20,9 ± 2,9 мкг/сут, p < 0,0001). В контрольной группе у 4 из 58 пациентов (6,8%) уровень меди в моче составлял 40 мкг/24 часа: у 2 пациентов была неалкогольная жировая болезнь печень, у 1 - узловая регенеративная гиперплазия, у 1 – аутоиммунный гепатит 2-го типа, и у всех уровень меди в моче был < 100 мкг/24 часа. Приемлемую диагностическую точность (чувствительность 78,9%, специфичность 87,9%) обеспечивало пороговое значение суточной экскреции меди с мочой 40 мкг/сут [100].

Представленные результаты были сопоставимы с результатами нашего исследования, где медиана суточной экскреции меди в моче (n = 96) составила 90,6 [55,1; 153,2] мкг/сут, в контрольной группе - 18,5 [13,0; 30,4] мкг/24часа (p < 0,001). Оптимальное соотношение чувствительности 82,3% и специфичности 87,0% обладало пороговое значение 50,8 мкг/сут (AUC 0,888(p <0,001) 95% ДИ: 0,823; 0,952).

Однако они расходились с данными отечественного педиатрического исследования от 2011г. (n=93), где оптимальное пороговое значение было сходно с нашим и составило 50,2 мкг/сут, но медиана суточной экскреции меди у пациентов с БВК была значимо выше, составляя 127 [86,2; 230,0] мкг/сут [21]. Подобные различия, наиболее вероятно, связаны с более ранним возрастом диагностики БВК у пациентов нашей когорты (9,2 [6,3;11,7] лет против 12,1±3,0 лет).

Настоящее исследование подтвердило наличие выраженной возрастной зависимости уровня суточной экскреции меди у пациентов с БВК, что обуславливает низкую диагностическую чувствительность общепринятого порога (>100 мкг/сут) в младших возрастных группах. Полученные данные свидетельствуют о необходимости дифференцированного подхода к интерпретации уровня меди в моче с учетом возраста пациента на момент диагностики.

Следует отметить, что даже уровень церулоплазмина, традиционно считающийся одним из наиболее надежных маркеров БВК, оказался в пределах нормы у 9% пациентов с генетически подтвержденным диагнозом. Это согласуется с наблюдениями Roberts E. и соавт., которые подчеркивали, что нормальный

уровень церулоплазмина не исключает БВК, особенно у детей раннего возраста [106].

Хотя в Лейпцигских критериях пороговые значения разделены на 10 мг/дл и 20 мг/дл, в четырех исследованиях, включавших в том числе педиатрическую когорту пациентов приводились пороговые значения, лежащие в диапазоне от 14 мг/дл до 19 мг/дл [85, 100, 115, 133]. По результатам системного обзора Ryan A. и соавт. максимальной чувствительностью и специфичностью обладало пороговое значение церулоплазмина 14 мг/дл [109].

В тоже время по данным Garcı́a-Villarreal L. и соавт. наиболее информативным пороговым значением церулоплазмина был уровень 11,5 мг/дл [61].

В нашем исследовании пороговое значение было несколько выше (16,9 мг/дл), однако оно также обладало высоким уровнями чувствительности 81,6% и специфичности 79,8%, а также данное значение укладывается в "наиболее информативный" диапазон снижения белка [109]. Это позволяет констатировать необходимость более углубленного обследования для исключения БВК у пациентов с незначительным снижением уровня церулоплазмина.

Отдельного внимания заслуживает анализ эффективности пробы с Д-пеницилламином. Хотя данный тест продемонстрировал 100% специфичность при пороговом значении >1600 мкг/24часа, его чувствительность оказалась неудовлетворительно низкой (16%). Эти результаты согласуются с исследованиями, которые также отмечали ограниченную диагностическую ценность этого теста в педиатрической практике [94,100].

По результатам Nicastro E. и соавт. у детей с БВК (n=40) экскреция меди с мочой после провокационного теста составила 771,3 ± 103,3 мкг/сут, а у пациентов контрольной группы - 585,5 ± 63,8 мкг/сут (p = 0,69). Среди пациентов БВК только у 12% (3/25) наблюдались значения >1575 мкг/сут: у всех них базальная экскреция меди >100 мкг/сут. Результаты ROC-анализа показали низкую диагностическую ценность стандартного порога 1575 мкг/сут - чувствительность составила лишь 12%. Снижение порогового значения до >500 мкг/сут и >200 мкг/сут повышало

чувствительность до 64% и 88% соответственно, однако статистическая значимость модели не была достигнута (p=0,10) [100].

По результатам другого педиатрического исследования (n=86) среднее значение меди в моче после пробы с Д-пеницилламином составило 1715,7±1031,8 мкг/сут, а пороговое значение 861 мкг/сут обладало чувствительностью 84,9% и специфичностью 83,8% [21].

По нашим данным у пациентов с БВК медиана суточной экскреции меди после пробы с Д-пеницилламином составила 806,8 [475,55; 1184,0] мкг/сут, а в контрольной группе 507,7 [321,5; 761,5] мкг/сут. Уровень 1600 мкг/24часа был у 37,5% (6/16) пациентов с нативным уровнем суточной экскреции меди в моче более 100 мг/24часа, и лишь у 10,5% (4/38) детей с отрицательным или сомнительным результатом нативной суточной экскреции меди с мочой.

Хотя по данным нашего ROC-анализа (AUC = 0,711 [0,577; 0,846]), полученная модель была статистически значимой (p = 0,023), пороговое значение 1600 мкг/сут также обладало низкой чувствительностью (16%), в то время как значение >250 мкг/сут характеризовалось более высокой чувствительностью (92%) при низкой специфичности (18%). Наиболее оптимальным соотношением чувствительности (70,3%) и специфичности (50,8%) обладало пороговое значение 557 мкг/24часа.

Предложенная альтернатива - использование 5-кратного превышения исходного уровня экскреции меди после провокационной пробы по результатам нашего исследования показала значительно лучшие результаты, позволив повысить значение данного показателя – до максимума (2 балла) у 55,2% пациентов с первоначально отрицательными или сомнительными результатами суточной экскреции меди с мочой. Этот подход представляется особенно перспективным для детей младшего возраста, у которых абсолютные значения экскреции меди часто не достигают общепринятых диагностических пороговых уровней. Использование данного метода в диагностике БВК все еще остается спорным, поскольку требует учета множества факторов при интерпретации его результатов.

В случае сомнительного диагноза, когда неинвазивные методы малоинформативны, для его уточнения показано проведение пункционной биопсии печени с последующим определением содержания меди в ткани печени, однако несмотря на высокую информативность, существует риск получения ложноотрицательных результатов, что может быть связано с бессимптомным течением или неврологической формой [136], а также с неоднородным распределением меди в печени и малыми размерами исследуемого биоптата [89], что ограничивает ее применение в педиатрии.

В крупном проспективном исследовании, включавшем 691 пациента, в том числе 178 - с БВК, среднее содержание меди в печени у пациентов с БВК составило 770,6 ± 393,2 мкг/г сухого веса, а значение 209 мкг (3,3 мкмоль)/г сухого веса обеспечивало наибольшую диагностическую точность для БВК (чувствительность: 99,4%; специфичность: 96,1%) [136]. Однако эта концентрация может быть недооценена из-за ошибок выборки [52, 121].

В нашем исследовании биопсия печени была проведена у 12,5% пациентов, диагностически значимое количество меди в ткани печени (>250 мкг/г) было зафиксировано у 75% больных.

Определение содержания меди в печени, при невозможности проведения молекулярно-генетического исследования, остается «золотым стандартом» в диагностике БВК в сложных клинических ситуациях, а также в случае недоступности молекулярно-генетического исследования, поскольку позволяет быстро получить результат. Срок выполнения анализа обычно не превышает 3–5 рабочих дней, в сравнении с ДНК-диагностикой, которая может занимать от 4 до 8 недель, особенно при секвенировании больших фрагментов или анализе редких мутаций. Таким образом, в клинических ситуациях, требующих срочной верификации диагноза (например, при быстром прогрессировании симптомов или неоднозначной клинической картине), биопсия с количественным анализом меди в ткани печени остается незаменимым методом, позволяющим своевременно начать терапию.

Лейпцигская диагностическая балльная система, валидированная как у взрослых, так и у детей, согласно исследованию Koppikar S. обладает высокой чувствительностью 98,1% и специфичностью 96,5% [78]. Однако ее информативность в педиатрической практике во многом зависит от результатов молекулярно-генетического исследования, исключение которого значимо снижает данные параметры. Исследование Балашовой М.С., проведенное у взрослых, показало, что у четверти (24,1%) пациентов без молекулярно-генетического исследования диагноз БВК был сомнительным, что преимущественно было обусловлено отсутствием колец Кайзера-Флейшера и незначительным снижением уровня церулоплазмина [29] .

В педиатрическом исследовании Четкиной Т.С. только у 16 (15,8%) из 101 ребенка диагноз был вероятен, а чувствительность шкалы составила 84%, однако необходимо учесть, что в рамках исследования большинству детей проводилась пункционная биопсия печени с дальнейшим определением содержания меди в ткани печени [21].

По нашим данным установить диагноз без проведения молекулярно-генетического исследования удалось 41,3% пациентам, у 38,5% обследуемых заболевание было вероятно, а у 20,2% - сомнительно. Установлено, что наиболее значимыми критериями, повлиявшими на постановку диагноза, оказались проба с Д-пеницилламином и обнаружение колец Кайзера-Флейшера.

Лейпцигская шкала диагностики без учета генетического тестирования, хотя и обладала высоким уровнем специфичности 100%, её чувствительность была значительно ниже (41,3%) относительно ранее представленных данных, что связано с минимальным числом детей, у которых была проведена биопсия печени.

Ввиду ограничения применения некоторых методов, в 2019 г. Nagral A. и соавт. была предложена модернизированная шкала диагностики БВК [94], валидация которой проведена только в стране создания. При использовании данной балльной системы получено сходное с Лейпцигской шкалой распределение: БВК установлена у 46,2% детей, вероятна у 29,8%, а у 20,2% пациентов не установлена. Однако, чувствительность была несколько выше в сравнении с Лейпцигской

шкалой, 46,1% и 41,3% соответственно, что в нашем исследовании было связано с исключением провокационного теста с Д-пеницилламином.

В тоже время, как отмечают Socha P. и соавт., полный отказ от провокационной пробы может снизить диагностическую точность у пациентов с пограничными лабораторными показателями [120]. Количество ложноотрицательных результатов (n=61) в исследуемой нами группе детей с генетически верифицированной БВК в первую очередь обусловлено отсутствием исследования количества меди в ткани печени, во вторую - возрастом диагностики заболевания, который является основополагающим фактором, влияющим на степень клинических, лабораторных и инструментальных изменений.

Сравнительный анализ Лейпцигской балльной системы (2001г.) и шкалы Nagral A. (2019г.) выявил существенные различия в их эффективности в разных возрастных группах. Традиционная шкала оказалась менее чувствительной у детей до 5 лет (диагноз установлен только у 33% пациентов), что связано с низкой частотой выявления у них колец Кайзера-Флейшера (выявлены лишь у 12,5% пациентов) или неврологической симптоматики, в отличие от модифицированной шкалы Nagral A., 2019г, которая показала лучшие результаты в аналогичной возрастной группе детей (диагноз установлен у 50%).

Таким образом, установлено, что модифицированная диагностическая шкала Nagral A. (2019г.) также может быть использована при диагностике БВК. Несмотря на это существующие диагностические алгоритмы без генетического тестирования, демонстрируют ограниченную эффективность в педиатрической практике, особенно у детей раннего возраста, и при их использовании на догенетическом этапе диагностики у детей с подозрением на БВК необходимо учитывать, что их информативность зависит от комплексности обследования и наличия или отсутствия факторов, влияющих на каждый из диагностических параметров.

Выявление биаллельных вариантов в гене *ATP7B* позволяет не только установить БВК без применения других методов исследования, но и диагностировать заболевание на доклиническом этапе. На сегодняшний день

известно более 900 вариантов в гене *ATP7B,* и этот список продолжает расти [69, 81]

Несмотря на небольшую выборку пациентов, включающую в том числе сибсов из нескольких семей, из 51 выявленного варианта наиболее распространенным у российских детей является *c.3207C>A, p.(His1069Gln)*, аллельная частота которого составила 45,5%. Сходная распространенность наблюдается в странах Восточной Европы, где его аллельная частота варьирует от 38 до 58%, в то время как в странах Западной Европы эти значения не превышают 20% [102].

В сравнении с исследованиями, проведёнными среди взрослых пациентов в РФ, у детей, согласно нашим результатам, данный вариант встречался несколько реже: 48-51,8% против 45,5% [29, 59]. Это может объясняться возрастными различиями, поскольку мажорный вариант ассоциирован с поздней манифестацией [53, 67].

В отечественных исследованиях у взрослых пациентов вариант *c.3190G>A, p.(Glu1064Lys)* занимал второе место по частоте: 8,4% среди пациентов из центральной части страны и 20% среди пациентов Дальневосточного федерального округа [29, 67]. В отличие от этого, в европейских выборках он не входит в спектр основных мутаций [65]. В нашем исследовании его аллельная частота оказалась существенно ниже — 5,7%, что, вероятно, связано с превалированием в исследуемой когорте детей из Центрального, Южного и Уральского федеральных округов.

Несмотря на то, что вариант *c.3402del, p.(Ala1135Glnfs*13)* преобладает в бразильской популяции (25–31%), в нашем исследовании его частота составила 6,5%, что соответствует данным работ, проведённых среди популяций славянского происхождения (4–6%) [43, 68].

Вариант *c.2333G>A*, *p.(Arg778Gln)* характерный для азиатских популяций, был выявлен менее чем у 2% пациентов в исследуемой группе. При этом в дальневосточной когорте его частота достигала 3% [59], тогда как в исследованиях

с преобладанием пациентов из Центральной России данный вариант не встречался [29] .

Частота миссенс-мутаций у детей (65,8%) была сопоставима с таковой у взрослых пациентов, тогда как доля нонсенс-мутаций и вариантов со сдвигом рамки считывания оказалась несколько выше, 23% против 16,5% соответственно [29].

В настоящем исследовании выявлено 14 ранее не описанных вариантов (27,4%; от общего числа выявленных вариантов) с суммарной аллельной частотой 9,5%. Зарубежные данные также демонстрируют значительное разнообразие генетического спектра БВК [43, 45, 79, 82, 82, 83], что наряду с большим числом новых вариантов, указывает на недостаточную изученность этиологии данного заболевания.

Практически в каждом исследовании, направленном на изучение спектра и относительных частот вариантов гена *ATP7B*, обнаруживаются ранее не описанные варианты, частота которых варьирует от 5 до 36% и зависит от объема выборки пациентов.

В результате работы выявлена комплексная дифференциация спектра мутаций гена *ATP7B* в российской популяции, обусловленная действием двух независимых факторов: этно-территориальной принадлежностью, определяющей аллельный профиль, и возрастом пациентов, проявляющимся в изменении спектра функциональных классов мутаций, в частности, повышении доли нонсенс-вариантов и делеций у детей.

Нами установлено существенное превосходство метода ВПС в выявляемости БВК перед таргетными подходами. Выявляемость БВК методом ВПС составила 99%, что закономерно обусловлено возможностью анализа всей кодирующей и прилегающей интронной последовательности гена *ATP7B*. Этот метод позволил идентифицировать биалелльные варианты у подавляющего большинства пациентов, включая случаи с редкими и ранее не описанными мутациями.

В отличие от ВПС, выявляемость БВК при помощи ПЦР-панелей оказалась существенно ниже и зависела от их состава. Расчетная выявляемость БВК на

панели с 12 частыми мутациями составила 39%, в то время как на предложенной в научной работе Garbuz M.M. и соавт. панели из 14 частых вариантов - 46% [60]. Это различие объясняется включением в расширенную панель дополнительных достаточно частых вариантов, таких как *c.3190G>A* и *c.3207C>A*, которые в нашем исследовании были идентифицированы у нескольких пациентов в компаунд-гетерозиготном состоянии с иными вариантами.

По данным Балашовой М.С. расчетная информативность ПЦР панели (12 мутаций) у взрослых пациентов с БВК (n=81) по пациентам составляла 88,3%, по аллелям 62,8%, и была значимо выше таковой у детей [29]. Описаний информативности второй панели в литературе найти не удалось, однако согласно данным разработчиков панели чувствительность метода составляет около 94% [60].

Согласно полученным результатам, выявляемость БВК при секвенировании экзонов 8, 13-16 по Сэнгеру составила 67%, что существенно превышает показатели в сравнении с использованием ПЦР-панелей, направленных на поиск частых мутаций.

Результаты исследования демонстрируют существенное методологическое превосходство ВПС, которое обеспечивает практически максимальный (99%) уровень детекции вариантов в гене *ATP7B*. Данное преимущество обусловлено возможностью анализа кодирующих и прилегающих интронных регионов гена *ATP7B*, что позволяет идентифицировать как частые, так и редкие, в том числе ранее не описанные. Таким образом, ВПС, с учетом дешевеющих реактивов в обозримом будущем, может быть признан в качестве золотого стандарта генетической диагностики данного заболевания.

Однако в настоящее время для теста первого уровня рассматривается более экономичное исследование экзонов 8, 13-16 методом секвенирования по Сэнгеру, которое показало существенно более высокую выявляемость (67%) по сравнению с коммерчески доступными таргетными ПЦР-панелями, направленными на поиск частых мутаций (39, 46%).

Для многих наследственных заболеваний изучение генотип-фенотипических корреляций обладает особой прогностической значимостью. Многочисленные

исследования, направленные на поиск корреляций, демонстрируют противоречивые данные: в ряде работ такая связь выявлялась, тогда как в других подтвердить ее не удалось [83].

Анализ взаимосвязей генотипа и фенотипа в нашем исследовании показал, что у пациентов с гомозиготным вариантом *c.3207C>A* БВК манифестировала позже и характеризовалась более легким течением в сравнении с пациентами, у которых хотя бы на одном аллеле был другой вариант, что согласуется с данными литературы [29, 119]

По данным одного исследования, включающего взрослых пациентов из восточной части России, неврологическая симптоматика чаще наблюдалась у пациентов с вариантами *c.3207C>A* и *c.3190G>A*, а печеночная симптоматика, сочетающаяся с различными нетипичными для БВК проявлениями, у пациентов с вариантом *c.2304insC* [59]. Однако в нашем исследовании не выявлено достоверных различий в частоте неврологических проявлений между группами с разными генотипами, но установлено, что ее формирование связано с возрастом диагностики БВК, что согласуется с выводами Ferenci P. и соавт [55].

Наличие в генотипе вариантов, приводящих к преждевременной терминации трансляции, ассоциировалось с ранней манифестацией, в том числе до 5 лет, и более тяжелым поражением печени, включая цирроз, и более низкими уровнями церулоплазмина, что подтверждается литературными данными [43, 68, 81]. В тоже время Gromadzka G. и соавт. обнаружили, что у пациентов с двумя вариантами, приводящими к укорочению кодируемого белка, наблюдалась самая высокая суточная экскреция меди с мочой [68], в нашем исследовании подобных корреляций не было выявлено, что вероятно связано с возрастом пациентов, включенных в наше исследование.

Проведенный анализ генотип-фенотипических взаимосвязей при БВК демонстрирует их сложный и неоднозначный характер. С одной стороны, установлена четкая ассоциация между вариантами, приводящими к преждевременной терминации трансляции и ранней манифестацией с выраженным печеночным повреждением. С другой стороны, для многих миссенс-мутаций,

включая *c.3207C>A*, фенотипические проявления вариабельны, а ожидаемые корреляции (например, между определенными генотипами и неврологической симптоматикой) не носят строгого характера. Это указывает на существенное влияние дополнительных модифицирующих факторов, таких как возраст, и подчеркивает, что прогноз заболевания не может быть основан исключительно на данных генотипирования.

У пациентов с БВК, в том числе детского возраста, степень выраженности фиброза печени является ключевым фактором, определяющим тяжесть функциональных нарушений печени и прогноза заболевания. Терминальный фиброз (цирроз) легко диагностируется по отклонениям стандартных биохимических маркеров, однако дифференциальная диагностика ранних и промежуточных стадий фиброза (F1-F3) представляет значительные клинические трудности, что согласуется с литературными данными и нашими результатами [18].

TGF-β является ключевым медиатором активации звездчатых клеток печени (ЗКП) и запускает процессы синтеза внеклеточного матрикса (ВКМ). PDGF-BB усиливает пролиферацию активированных ЗКП и стимулирует их миграцию в зоны повреждения [6]. CTGF, в свою очередь, потенцирует эффекты TGF-β и способствует накоплению коллагена [6, 70]. На терминальной стадии заболевания наблюдается значительное истощение клеточных источников цитокинов (ЗКП, макрофаги, гепатоциты) и выраженные морфологические изменения печени, что может объяснять резкое снижение уровней этих маркеров при F4.

Нами установлено, что уровни TGF-β, PDGF-BB и CTGF оказались ниже при циррозе (F4), тогда как на ранних стадиях фиброза (F1–F2) концентрации TGF-β и PDGF-BB превышали референсные значения, что позволяет рассматривать эти цитокины в качестве потенциальных маркеров прогрессирования фиброза.

Выявленная динамика TGF-β соответствует результатам исследований при хронических вирусных гепатитах [70, 77, 99] и гликогенозах [16], где максимальные концентрации маркера регистрировались на промежуточных стадиях фиброза с последующим снижением при F4. Аналогичная тенденция отмечена в работе

Palekar N. и соавт. при МАЖБП [103], что подтверждает универсальную роль TGF-β в инициации фиброгенеза независимо от этиологии поражения печени.

По некоторым данным уровень PDGF-BB, фактор роста стимулирующийся TGF-β и способствующий активации звёздчатых клеток печени и отложению коллагена, также отличается при фиброзе печени различной этиологии [70, 73, 137]. В нашем исследовании PDGF-BB, аналогично данным Zhou J. и соавт. и Zhang B-B. и соавт. при ХГВ и ХГС, коррелировал со стадией фиброза: низкие значения определялись на стадии цирроза [139, 140]. Это может быть обусловлено не только истощением продуцирующих клеток, но и тромбоцитопенией, характерной для поздних стадий хронических заболеваний печени.

Обнаруженные корреляционные взаимосвязи TGF-β и PDGF-BB с показателями функциональной активности печени (уровнем альбумина, количеством тромбоцитов и концентрацией прямого билирубина) свидетельствуют о тесной взаимосвязи между цитокиновым профилем и выраженностью функциональной недостаточности печени.

Полученные в ходе исследования достоверные положительные корреляции между уровнями TGF-β и PDGF-BB и показателями липидного обмена (общим холестерином и триглицеридами), по-видимому, отражают снижение белково-синтетической функции печени. Данное предположение согласуется с результатами исследования Arain S. Q. и соавт., которые выявили значимое уменьшение концентраций холестерина и триглицеридов у пациентов с циррозом печени вирусной этиологии по сравнению с контрольной группой [26].

Примечательно, что в отличие от других хронических заболеваний печени, мы не обнаружили значимой корреляции TGF-β с активностью аминотрансфераз или маркерами холестаза, что согласуется с результатами Nelson D. и соавт. и может свидетельствовать об особенностях патогенеза фиброза при БВК, где ключевую роль играют не воспалительные или холестатические механизмы, а прямое цитотоксическое действие меди [98].

Избыточное накопление тканевой меди индуцирует образование свободных радикалов с истощением антиоксидантных систем, способствует окислению

липидов, ферментов и структурных белков. Снижение активности митохондриальных ферментов и повреждение клеточных органелл приводит к перекисному окислению липидов, накоплению триглицеридов, некрозу и апоптозу гепатоцитов, а также активации клеток Купфера - основных источников профибротических факторов (TGF-β, PDGF-BB, VEGF), запускающих процесс фиброзирования [17]. Установленные нами слабые, но статистически значимые корреляции между концентрациями TGF-β, PDGF-BB и VEGF с уровнем экскреции меди с мочой могут отражать адаптационно-компенсаторный ответ на токсическое действие меди и предшествовать развитию выраженных структурных изменений печени [62], что подчеркивает перспективность их изучения в качестве потенциальных маркеров доклинического фиброгенеза при БВК.

CTGF и VEGF как маркеры фиброза печени изучены в значительно меньшей степени по сравнению с TGF-β и PDGF-BB. В нашем исследовании CTGF, являющийся важным медиатором фиброгенеза и активируемый под действием TGF-β, также имел более низкие концентрации на поздних стадиях фиброза. Эти данные частично согласуются с результатами El-Bassiouni N.и соавт., обнаружившими значительное увеличение экспрессии как CTGF, так и TGF-β1 в печеночной ткани, коррелирующее со стадией фиброза [47]. Подобные расхождения могут быть обусловлены несколькими факторами: различиями в исследуемых биологических материалах, особенностями патогенеза БВК по сравнению с другими хроническими заболеваниями печени, а также возможным влиянием антифибротической терапии на цитокиновый профиль.

При попарном сравнении концентраций цитокинов у детей до лечения и через 12 месяцев терапии нами выявлено снижение концентрации TGF-β у 66,6% детей (p=0,036) с 57162 [34223;71779] пг/мл до 45684 [31984;58430] пг/мл, а также отмечено достоверное снижение степени фиброза по данным эластометрии у 88,8% пациентов (p=0,011) - медиана показателя уменьшилась с 9 [6,1;17,4] кПа до 6,2 [4,5;6,7] кПа. Одновременно установлено снижение концентрации TGF-β у 66,6% детей (p=0,036) с 57162 [34223;71779] пг/мл до 45684 [31984;58430] пг/мл.

Обнаруженные изменения согласуются с современными представлениями о возможности регресса фиброза при адекватной терапии БВК. Значимое уменьшение показателей эластометрии и уровня TGF-β, являющегося ключевым стимулятором фиброгенеза, свидетельствует о подавлении активности звездчатых клеток печени и может рассматриваться как прогностически благоприятный признак.

Особый интерес представляет парадоксальное повышение концентрации CTGF с 22,6 [2,3;30,7] нг/мл до 49,1 [18,1;78,5] нг/мл, отмеченное у 88,8% пациентов (p=0,038). Полученные данные могут отражать сложный характер ремоделирования внеклеточного матрикса в процессе регресса фиброза. Согласно литературным данным, CTGF участвует не только в процессах фиброгенеза, но и в регуляции репаративной регенерации, что позволяет интерпретировать увеличение его концентрации.

Хотя исследованные цитокины не могут служить надёжными критериями для точной верификации стадии фиброза, их концентрации объективно коррелируют с активностью фиброгенеза и процессов ремоделирования печёночной ткани. В связи с этим они перспективны не для первичной диагностики, а для динамического наблюдения за течением патологического процесса. В качестве наиболее перспективного лабораторного критерия для мониторинга эффективности терапии может рассматриваться TGF-β, что подтверждается достоверным снижением его уровня при достижении клинического ответа.

Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что диагностика БВК у детей требует комплексного подхода, учитывающего возрастные особенности пациентов. Существующие диагностические шкалы без генетического тестирования демонстрируют ограниченную эффективность у детей, однако могут быть использованы для отбора пациентов для дальнейшего генетического обследования. Определен спектр вариантов гена *ATP7B* в российской педиатрической когорте пациентов с БВК, на основе которого разработан алгоритм молекулярно-генетической диагностики. Установлены ассоциации между вариантами, приводящими к укорочению кодируемого белка, и ранним дебютом

заболевания, снижением уровня церулоплазмина, тяжелым поражением печени. Изучена динамика изменений концентраций профибротических цитокинов (TGF-β, PDGF-BB, CTGF) при БВК с их повышением на ранних стадиях фиброза и последующим снижением при циррозе, что отражает истощение синтетической функции печени. Установлен потенциальный маркер (TGF-β), который может быть использован для мониторинга эффективности лечения.

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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АЛТ – аланинамитрансфераза

АСТ – аспартатаминотрасфераза

АТФаза – аденозинтрифосфотаза

АТФ – аденозинтрифосфорная кислота

БВК – болезнь Вильсона-Коновалова

ВКМ – внутриклеточный матрикс

ВПС – высокопроизводительное секвенирование

ГГТ – гамма-глутамилтранспептидаза

ДНК – дизоксирибонуклеиновая кислота

ЗКП- звездчатые клетки печени

ИФА- иммуноферментный анализ

МАЖБП – метаболически ассоциированная жировая болезнь печени

МРТ – магнитно-резонансная томография

НАЖБП – неалкогольная жировая болезнь печени

НАСГ – неалкогольный стеатогепатит

ОПН – острая печеночная недостаточность

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СОЭ – скорость оседания эритроцитов

ХГВ – хронический гепатит В

ХГС – хронический гепатит С

ЩФ – щелочная фосфатаза

VUS – варианты неясной значимости

CTGF – фактор роста соединительной ткани

MLPA – мультиплексная лигазная цепная реакция

PDGF-BB – тромбоцитарный фактор роста

TGF-β – трансформирующий фактор роста β

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баязутдинова Г.М., Щагина О.А., Карунас А.С., Вялова Н.В., Соколов А.А., Поляков А.В. Спектр мутаций в гене ATP7B у российских больных с болезнью Вильсона–Коновалова. Генетика. 2019;55(12):1433–1441 doi: 10.1134/S0016675819120026.

2. Волынец Г.В., Никитин А.В., Скворцова Т.А. Болезнь Вильсона у детей: проблемы и перспективы. Доказательная Гастроэнтерология. 2024;13(3): 80–96. doi: 10.17116/dokgastro20241303180

3. Вялова Н.В., Проскокова Т.Н., Баязутдинова Г.М., Тен Н.Н., Нам С.И., Хелимский А.М. Молекулярно-генетический анализ у больных гепатолентикулярной дегенерацией в Хабаровском крае. Дальневосточный Медицинский Журнал. 2016;2:72–75.

4. Гернер Е.А., Назаров В.Д., Федорова Т.Ф., Лапин С.В., Павлова Т.А., Новиков С.А. и др. Клинико-лабораторная и молекулярно-генетическая диагностика болезни Вильсона-Коновалова. Российский неврологический журнал. 2019;24(3): 10–18. doi: 10.30629/2658-7947-2019-24-3-10-18.

5. Гуляева С. Е., Овчинников А. В. Молекулярный дефект гепатолентикулярной дегенерации и его клиническое отражение. Тихоокеанский Медицинский Журнал. 2013; 4 (54):98–102.

6. Лебедева Е.И., Мяделец О.Д. Клеточно-молекулярные механизмы фиброгенеза печени. Гепатология и гастроэнтерология. 2019;2(3):119–126. doi:10.25298/2616-5546-2019-3-2-119-126.

7. Карунас А.С., Магжанова А.Р., Магжанов Р.В., Гайсина Е.В., Мурзабаева С.Ш., Хуснутдинова Э.К. Молекулярно-генетическое исследование болезни Вильсона в Республике Башкортостан. Медицинская Генетика. 2009;8 (86): 41–48.

8. Комарова А.Д., Потапов А.С., Савостьянов К.В., Пушков А.А., Мовсисян Г.Б., Усольцева О.В. и др. Сложности диагностики болезни Вильсона у детей раннего возраста. Вопросы детской диетологии. 2024; 22(2): 13–21. doi: 10.20953/1727-5784-2024-2-13-21.

9. 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. doi: 10.46563/2686-8997-2024-5-4-184-191

10. 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. doi: 10.20953/1727-5784-2025-3-13-23.

11. Комарова А.Д., Курбатова О.В., Мовсисян Г.Б., Жужула А.А., Сновская М.А., Хохлов Д.Н. и др. Сывороточные маркеры фиброза печени TGF-β, PDGF, CTGF и VEGF при болезни Вильсона – Коновалова у детей. Кремлевская медицина. Клинический вестник. 2025; 3: 5–11. doi: 10.48612/cgma/dzaa-4m7g-x8ft.

12. 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. doi:10.25557/2073-7998.2026.02.33-44

13. Кудрявцев А.А., Коваленко С.П., Горностаева Е.В., Воевода М.И., Максимов В.Н. The frequency of mutations in the ATP7B gene in Russia. Meta Gene. 2017;13: 173–176. doi: 10.1016/j.mgene.2017.06.005.

14. Кулебина Е.А., Сурков А.Н., Куликов К.А., Потапов А.С., Бессонов Е.Е. Валидация показателей транзиентной эластографии для оценки стадии фиброза печени у детей. Лечащий Врач. 2020;8: 57–60. doi: 10.26295/OS.2020.26.84.009.

15. Кулебина Е.А., Сурков А.Н., Фисенко А,П,, Потапов А.С., Алябьева Н.М., Зубкова И.В. и др. Информативность определения сывороточных концентраций прямых биомаркёров при диагностике различных стадий фиброза печени у детей. Российский Педиатрический Журнал. 2021;24(1): 4–11. doi 10.46563/1560-9561-2021-24-1-4-11.

16. Курбатова О.В., Закиров Р.Ш., Сурков А.Н., Никитин А.В., Самохина И.В., Фрейдлин Е.В. Уровень сывороточных цитокинов при различных стадиях фиброза

печени у детей с печеночными формами гликогеновой болезни. Клиническая лабораторная диагностика. 2016; 61 (9):537. doi: 0.18821/0869-2084-2016-61-9.

17. Курбатова О.В., Петричук С.В., Купцова Д.Г., Радыгина Т.В.,Семикина Е.Л., Потапов А.С. и др. Возрастные особенности субпопуляционного состава и метаболизма лимфоцитов у детей с болезнью Вильсона – Коновалова. Кремлевская медицина. Клинический вестник. 2023;2:5-11. doi: 10.48612/cgma/a5rx-evxd-xkk9.

18. Мехтиев С.Н., Степаненко В.В., Зиновьева Е.Н., Мехтиева О.А. Современные представления о фиброзе печени и методах его коррекции. Фарматека. 2014: 6(279): 80–87.

19. Мовсисян Г.Б., Гундобина О.С., Намазова-Баранова Л.С., Савостьянов К.В., Пушков А.Н., Черников В.В. и др. Демографическая и клинико-генетическая характеристика детей с болезнью Гоше в Российской Федерации: данные педиатрического регистра. Педиатрическая Фармакология. 2016:13(4):354–361 doi: 10.15690/pf.v13i4.1607.

20. Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б., Коновалов Ф.А., Масленников А.Б., Степанов В.А. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2). Медицинская Генетика. 2019;18(2): 3-23. doi:10.25557/2073-7998.2019.02.3-23.

21. Чёткина Т. С. Болезнь Вильсона у детей: диагностика, течение и прогноз 2011. С. 27.

22. Aksu A.Ü., Sarı S.,Gürkan Ö.E.,Dalgıç B. Urinary 24-hour copper excretion at the time of diagnosis in children with Wilson’s disease. Acta Gastro-Enterologica Belgica. 2018;81(3):410-414.

23. Ala A., Borjigin J., Rochwarger A., Schilsky M. Wilson disease in septuagenarian siblings: Raising the bar for diagnosis. Hepatology (Baltimore, Md.). 2005;41(3):668-70. doi: 10.1002/hep.20601.

24. Aldámiz-Echevarría L., Llarena M., Bueno M. A., Dalmau J.,Vitoria I., Fernández-Marmiesse A. at al. Molecular epidemiology, genotype-phenotype correlation and BH4

responsiveness in Spanish patients with phenylketonuria. Journal of Human Genetics. 2016;61(8):731-44. doi: 10.1038/jhg.2016.38.

25. Alkhouri N., Gonzalez-Peralta R.P., Medici V. Wilson disease: a summary of the updated AASLD Practice Guidance. Hepatology Communications. 2023 ;7(6):e0150.doi: 10.1097/HC9.0000000000000150.

26. Arain S.Q., Talpur F.N., Channa N.A., Ali M.S., Afridi H.I. Serum lipid profile as a marker of liver impairment in hepatitis B Cirrhosis patients. Lipids in Health and Disease. 2017;16(1): 51. doi: 10.1186/s12944-017-0437-2.

27. Arredondo M., Núñez M.T. Iron and copper metabolism. Molecular Aspects of Medicine. 2005;26(4-5): 313-27. doi: 10.1016/j.mam.2005.07.010.

28. Au K. S., Williams A.T., Roach E.S., Batchelor L., Sparagana S.P., Delgado M.R. et al. Genotype/phenotype correlation in 325 individuals referred for a diagnosis of tuberous sclerosis complex in the United States. Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics. 2007;9(2):88-100. doi: 10.1097/gim.0b013e31803068c7.

29. Balashova M.S., Tuluzanovskaya I.G., Glotov O.S., Glotov A.S., Barbitoff Y. A., Fedyakov M. A. et al. The spectrum of pathogenic variants of the ATP7B gene in Wilson disease in the Russian Federation. Journal of trace elements in medicine and biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS). 2020; 59:126420. doi: 10.1016/j.jtemb.2019.126420.

30. Baranova A., Lal P., Birerdinc A., Younossi Z.M. Non-Invasive markers for hepatic fibrosis. BMC Gastroenterology. 2011;17:11:91. doi: 10.1186/1471-230X-11-91

31. Bataller R., Brenner D. A. Liver fibrosis. The Journal of Clinical Investigation. 2005; 115(2):209-18. doi: 10.1172/JCI24282.

32. Beyzaei Z., Mehrzadeh A., Hashemi N., Geramizadeh B. The mutation spectrum and ethnic distribution of Wilson disease, a review. Molecular Genetics and Metabolism Reports. 2024;38:101034. doi: 10.1016/j.ymgmr.2023.101034.

33. Brenner D. A. Molecular pathogenesis of liver fibrosis. Transactions of the American Clinical and Climatological Association. 2009;120:361-8.

34. Cai Y., Huang G., Ma L., Dong L., Chen S., Shen X. et al. Smurf2, an E3 ubiquitin ligase, interacts with PDE4B and attenuates liver fibrosis through miR-132 mediated CTGF inhibition. Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Cell Research. 2018;1865(2):297-308. doi: 10.1016/j.bbamcr.2017.10.011.

35. Capone K., Azzam R. K. Wilson's Disease: A Review for the General Pediatrician. Pediatric Annals. 2018 ;47(11):e440-e444. doi: 10.3928/19382359-20181026-01.

36. Castéra L., Vergniol J.,Foucher J.,Le Bail B., Chanteloup E., Haaser M. et al. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. Gastroenterology. 2005;128(2):343-50. doi: 10.1053/j.gastro.2004.11.018.

37. Chabik G., Litwin T., Członkowska A. Concordance rates of Wilson's disease phenotype among siblings. Journal of Inherited Metabolic Disease. 2014;37(1):131-5. doi: 10.1007/s10545-013-9625-z.

38. Chanpong A., Dhawan A. Wilson disease in children and young adults - State of the art. Saudi Journal of Gastroenterology: Official Journal of the Saudi Gastroenterology Association. 2022;28(1):21-31. doi: 10.4103/sjg.sjg_501_21.

39. Chen H., Wang X, Xing J.,Pu Y.,Ye H., Ma Y. et al. Role and mechanisms of cuproptosis in the pathogenesis of Wilson's disease (Review). International Journal of Molecular Medicine. 2025 ;56(2):117. doi: 10.3892/ijmm.2025.5558.

40. Choe E. J., Choi J.W.,Kang M., Lee Y.K., Jeon H.H., ParkB.K. et al. A population-based epidemiology of Wilson's disease in South Korea between 2010 and 2016. Scientific Reports. 2020;10(1):14041. doi: 10.1038/s41598-020-70976-1.

41. Coffey A. J., Durkie M., Hague S., McLay K., Emmerson J., Lo C. et al. A genetic study of Wilson's disease in the United Kingdom. Brain: A Journal of Neurology. 2013 ;136(5):1476-87. doi: 10.1093/brain/awt035.

42. Corpechot C., El Naggar A., Poujol-Robert A., Ziol M., Wendum D., Chazouillères O. et al. Assessment of biliary fibrosis by transient elastography in patients with PBC and PSC. Hepatology (Baltimore, Md.). 2006;43(5):1118-24. doi: 10.1002/hep.21151.

43. Couchonnal E., Bouchard S., Sandahl T. D., Pagan C., Lion-François L., Guillaud O. et al. ATP7B variant spectrum in a French pediatric Wilson disease cohort. European Journal of Medical Genetics. 2021;64(10):104305. doi: 10.1016/j.ejmg.2021.104305.

44. Członkowska A., Litwin T., Dusek P.,Ferenci P., Lutsenko S., Medici V. et al. Wilson disease. Nature Reviews. Disease Primers. 2018;4(1):21. doi: 10.1038/s41572-018-0018-3.

45. Dong Y., Ni W., Chen W-J., Wan B., Zhao G.-X., Shi Z.-Q. et al. Spectrum and Classification of ATP7B Variants in a Large Cohort of Chinese Patients with Wilson's Disease Guides Genetic Diagnosis. Theranostics. 2016;6(5):638-49. doi: 10.7150/thno.14596.

46. Dong Y., Wang R.-M.,Yang G.-M., Yu H., Xu W.-Q., Xie J.-J. et al. Role for Biochemical Assays and Kayser-Fleischer Rings in Diagnosis of Wilson's Disease. Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association. 2021;19(3):590-596. doi: 10.1016/j.cgh.2020.05.044.

47. El-Bassiouni N. E., Nosseir M. M. F., Madkour M. E., Zoheiry M. M. K., Bekheit I. W., Ibrahim R. A. et al. Role of fibrogenic markers in chronic hepatitis C and associated hepatocellular carcinomaıo Molecular Biology Reports. 2012;39(6):6843-50. doi: 10.1007/s11033-012-1509-z.

48. Espinós C., Ferenci P. Are the new genetic tools for diagnosis of Wilson disease helpful in clinical practice? JHEP reports: innovation in hepatology. 2020;2(4):100114. doi: 10.1016/j.jhepr.2020.100114.

49. European Association for the Study of the Liver EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease. Journal of Hepatology. 2012;56 (3): 671–685.

50. European Association for the Study of the Liver EASL-ERN Clinical Practice Guidelines on Wilson's disease. Journal of Hepatology. 2025;S0168-8278(24)02706–5.

51. Favre E., Lion-François L., Canton M., Vanlemmens C., Bonneton M., Bouillet L. et al. Cognitive Abilities of Children With Neurological and Liver Forms of Wilson Disease. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. 2017;64(3):436-439. doi: 10.1097/MPG.0000000000001346.

52. Ferenci P., Steindl-Munda P., Vogel W., Jessner W., Gschwantler M., Stauber R. et al. Diagnostic value of quantitative hepatic copper determination in patients with Wilson's Disease. Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association. 2005;3(8):811-8. doi: 10.1016/s1542-3565(05)00181-3.

53. Ferenci P. Phenotype-genotype correlations in patients with Wilson's disease. Annals of the New York Academy of Sciences. 2014;1315:1-5. doi: 10.1111/nyas.12340

54. Ferenci P. Chapter 14 - Diagnosis of Wilson disease Wilson Disease. Handbook of Clinical Neurology. Elsevier. 2017;171–180. doi: 10.1016/B978-0-444-63625-6.00014-8.

55. Ferenci P., Stremmel W., Członkowska A., Szalay F., Viveiros A., Stättermayer A.F. et al. Age and Sex but Not ATP7B Genotype Effectively Influence the Clinical Phenotype of Wilson Disease. Hepatology (Baltimore, Md.). 2019;69(4):1464-1476. doi: 10.1002/hep.30280.

56. Fernando M., Mourik I., Wassmer E., Kelly D. Wilson disease in children and adolescents. Archives of Disease in Childhood. 2020;105(5):499-505. doi: 10.1136/archdischild-2018-315705.

57. Forbes J.R., Cox D.W. Copper-dependent trafficking of Wilson disease mutant ATP7B proteins. Human Molecular Genetics. 2000;9(13):1927-35. doi: 10.1093/hmg/9.13.1927.

58. Friedman S. L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. Physiological Reviews. 2008;88(1):125-72. doi: 10.1152/physrev.00013.2007.

59. Garbuz M., Ovchinnikova E., Ovchinnikova A., Vinokurova V., Aristarkhova Y., Kuziakova O. et al. Spectrum of Pathogenic Variants of the ATP7B Gene and Genotype-Phenotype Correlation in Eastern Eurasian Patient Cohorts with Wilson's Disease // Biomedicines. 2024;12(12):2833. doi: 10.3390/biomedicines12122833.

60. Garbuz M.M., Ovchinnikova A.A., Kumeiko V.V. Design, Optimization and Validation of the ARMS PCR Protocol for the Rapid Diagnosis of Wilson's Disease Using a Panel of 14 Common Mutations for the European Population. Genes. 2022;13(11):1940. doi: 10.3390/genes13111940.

61. García-Villarreal L., Hernández-Ortega A., Sánchez-Monteagudo A., Peña-Quintana L., T Ramírez-Lorenzo T., Riaño M. et al. Wilson disease: revision of diagnostic criteria in a clinical series with great genetic homogeneity. Journal of Gastroenterology. 2021 ;56(1):78-89. doi: 10.1007/s00535-020-01745-0.

62. Gerosa C., Fanni D., Congiu T., Piras M., Cau F., Moi M. et al. Liver pathology in Wilson's disease: From copper overload to cirrhosis. Journal of Inorganic Biochemistry. 2019 :193:106-111. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2019.01.008.

63. Ghosh U., Sen Sarma M., Samanta A. Challenges and dilemmas in pediatric hepatic Wilson's disease. World Journal of Hepatology. 2023:193:106-111. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2019.01.008.

64. Gialluisi A., Incollu S., Pippucci T., Lepori M.B., Zappu A.,Loudianos G. et al. The homozygosity index (HI) approach reveals high allele frequency for Wilson disease in the Sardinian population. European journal of human genetics: EJHG. 2013 ;21(11):1308-11. doi: 10.1038/ejhg.2013.43.

65. Gomes A., Dedoussis G.V. Geographic distribution of ATP7B mutations in Wilson disease. Annals of Human Biology. 2016;43(1):1-8. doi: 10.3109/03014460.2015.1051492.

66. Gómez-Domínguez E., Mendoza J., Rubio S., Moreno-Monteagudo J.A., García-Buey L., Moreno-Otero R. Transient elastography: a valid alternative to biopsy in patients with chronic liver disease. Alimentary Pharmacology & Therapeutics. 2006;24(3):513-8. doi: 10.1111/j.1365-2036.2006.02999.x.

67. Gorukmez O., Özgür T., Gorukmez O., Topak A. ATP7B Gene Variant Profile İdentified by NGS in Wilson's Disease. Fetal and Pediatric Pathology. 2023;42(6):891-900. doi: 10.1080/15513815.2023.2260005.

68. Gromadzka G., Schmidt H. H.-J., Genschel J., Bochow B., Rodo M., TarnackaB. et al. Frameshift and nonsense mutations in the gene for ATPase7B are associated with severe impairment of copper metabolism and with an early clinical manifestation of Wilson's disease. Clinical Genetics. 2005;68(6):524-32. doi: 10.1111/j.1399-0004.2005.00528.x.

69. Gupta A., Bhattacharjee A., Dmitriev O.Y., Nokhrin S., Braiterman L., Hubbard A.L. et al. Cellular copper levels determine the phenotype of the Arg875 variant of ATP7B/Wilson disease protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2011;108(13):5390-5. doi: 10.1073/pnas.1014959108.

70. Haghgoo S.M., Sharafi H., Alavian S.M. Serum cytokines, adipokines and ferritin for non-invasive assessment of liver fibrosis in chronic liver disease: a systematic review. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2019;57(5):577-610. doi: 10.1515/cclm-2018-0357.

71. Hu J., Maegawa G. H. B., Zhan X., Gao X., Wang Y., Xu F. et al. Clinical, biochemical, and genotype-phenotype correlations of 118 patients with Niemann-Pick disease Types A/B. Human Mutation. 2021;42(5):614-625. doi: 10.1002/humu.24192.

72. Huster D., Kühne A., Bhattacharjee A., Raines L., Jantsch V., Noe J. et al. Diverse functional properties of Wilson disease ATP7B variants.Gastroenterology. 2012;142(4):947-956.e5. doi: 10.1053/j.gastro.2011.12.048.

73. Ikura Y., Morimoto H., Ogami M., Jomura H., Ikeoka N., Sakurai M. Expression of platelet-derived growth factor and its receptor in livers of patients with chronic liver disease. Journal of Gastroenterology. 1997;32(4):496-501. doi: 10.1007/BF02934089.

74. Jat K.R., Chowdhury M.R., Dhochak N., Lodha R.,Varkki S., Kumar P. et al. Genotype-Phenotype Correlation in Children With Cystic Fibrosis From India: A Multicentric Study. Clinical Genetics. 2025;109(3):481-489. doi: 10.1111/cge.70063.

75. Jiao J., Friedman S.L., Aloman C. Hepatic fibrosis. Current Opinion in Gastroenterology. 2009;25(3):223-9. doi: 10.1097/mog.0b013e3283279668.

76. Kerkar N., Rana A. Wilson Disease in Children. Clinics in Liver Disease. 2022;26(3):473-488. doi: 10.1016/j.cld.2022.03.008.

77. Kirmaz C., Terzioglu E., Topalak O., Bayrak P., Yilmaz O., Ersoz G. et al. Serum transforming growth factor-beta1(TGF-beta1) in patients with cirrhosis, chronic hepatitis B and chronic hepatitis C [corrected]. European Cytokine Network. 2004;15(2):112-6.

78. Koppikar S., Dhawan A. Evaluation of the scoring system for the diagnosis of Wilson’s disease in children. Liver International: Official Journal of the International

Association for the Study of the Liver. 2005;25(3):680-1. doi: 10.1111/j.1478-3231.2005.01072.x.

79. Kumari N., Kumar A., Thapa B.R., Modi M., Pal A., Prasad R. Characterization of mutation spectrum and identification of novel mutations in ATP7B gene from a cohort of Wilson disease patients: Functional and therapeutic implications. Human Mutation. 2018;39(12):1926-1941. doi: 10.1002/humu.23614.

80. Lao T.D., Le T.A.H. Systematic Analysis and Insights Into the Mutation Spectrum and Ethnic Differences in ATP7B Mutations Associated With Wilson Disease. Biomarker Insights. 2024;19:11772719241297169. doi: 10.1177/11772719241297169.

81. Li M., Ma J., Wang W., Yang X., Luo K. Mutation analysis of the ATP7B gene and genotype–phenotype correlation in Chinese patients with Wilson disease. BMC Gastroenterology. 2021;21(1):339. doi: 10.1186/s12876-021-01911-5.

82. Li S., Lin Y., Chen S., Zhang W., Chen Y.-M., Lu X. et al. Clinical characteristics and prognosis of early diagnosed Wilson's disease: A large cohort study. Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver. 2024; 44(9):2424-2433. doi: 10.1111/liv.16009.

83. Liu P., Che F., Shu C., Li Y., Liu X. [Analysis of clinical phenotypes and ATP7B gene variants in 75 children patients with Wilson' s disease]. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi. 2022;39(4):357-361. doi: 10.3760/cma.j.cn511374-20201231-00926.

84. Lu X, Li S., Zhang W., Lin Y., Lu Z., Cai Y. et al. Assessment of the diagnostic value of serum ceruloplasmin for Wilson's disease in children. BMC gastroenterology. 2022;22(1):124. doi: 10.1186/s12876-022-02186-0.

85. Mak C.M., Lam C.-W., Tam S. Diagnostic accuracy of serum ceruloplasmin in Wilson disease: determination of sensitivity and specificity by ROC curve analysis among ATP7B-genotyped subjects. Clinical Chemistry. 2008;54(8):1356-62. doi: 10.1373/clinchem.2008.103432.

86. Malhi H., Guicciardi M.E., Gores G.J. Hepatocyte death: a clear and present danger. Physiological Reviews. 2010;90(3):1165-1194. doi: 10.1152/physrev.00061.2009.

87. Margarit E., Bach V., Gómez D., Bruguera M., Jara P., Queralt R. et al. Mutation analysis of Wilson disease in the Spanish population -- identification of a prevalent

substitution and eight novel mutations in the ATP7B gene. Clinical Genetics. 2005;68(1):61-68. doi: 10.1111/j.1399-0004.2005.00439.x.

88. Medrano S., Monges S., Gravina L.P., Alías L., Mozzoni J. et al. Genotype-phenotype correlation of SMN locus genes in spinal muscular atrophy children from Argentina. European journal of paediatric neurology: EJPN: official journal of the European Paediatric Neurology Society. 2016;20(6):910-917. doi: 10.1016/j.ejpn.2016.07.017.

89. Merle U., Eisenbach C., Weiss K.H., Tuma S., Stremmel W. Serum ceruloplasmin oxidase activity is a sensitive and highly specific diagnostic marker for Wilson's disease. Journal of Hepatology. 2009;51(5):925-30. doi: 10.1016/j.jhep.2009.06.022.

90. Pavelková M., Vysloužil J., Kubová K., Vetchý D. Biological role of copper as an essential trace element in the human organism. Ceska a Slovenska Farmacie: Casopis Ceske Farmaceuticke Spolecnosti a Slovenske Farmaceuticke Spolecnosti. 2018;67(4):143-153.

91. Mukherjee S., Dutta S., Majumdar S., Biswas T., Jaiswal P. et al. Genetic defects in Indian Wilson disease patients and genotype-phenotype correlation. Parkinsonism & Related Disorders. 2014;20(1):75-81. doi: 10.1016/j.parkreldis.2013.09.021.

92. Müller T., Koppikar S., Taylor R.M., Carragher F., Schlenck B. et al. Re-evaluation of the penicillamine challenge test in the diagnosis of Wilson's disease in children. Journal of Hepatology. 2007;47(2):270-276. doi: 10.1016/j.jhep.2007.03.011.

93. Mulligan C., Bronstein J. M. Wilson Disease: An Overview and Approach to Management. Neurologic Clinics. 2020;38(2):417-432. doi: 10.1016/j.ncl.2020.01.005.

94. Nagral A., Sarma M.S., Matthai J., Kukkle P.L., Devarbhavi H., Sinha S. et al. Wilson's Disease: Clinical Practice Guidelines of the Indian National Association for Study of the Liver, the Indian Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, and the Movement Disorders Society of India. Journal of Clinical and Experimental Hepatology. 2019;9(1):74-98. doi: 10.1016/j.jceh.2018.08.009.

95. Nagral A., Mallakmir S., Garg N., Tiwari K., Masih S., Nagral N. et al. Genomic Variations in ATP7B Gene in Indian Patients with Wilson Disease. Indian Journal of Pediatrics. 2023;90(3):240-248. doi: 10.1007/s12098-022-04250-9.

96. Naorniakowska M., Dądalski M., Kamińska D., Jańczyk W., Lebensztejn D., Fyderek K. et al. Clinical presentations of Wilson disease among Polish children. Developmental Period Medicine. 2016;20(3):216-221.

97. Nehring P., Szeligowska J., Przybyłkowski A. Elastography of the Liver in Wilson's Disease. Diagnostics (Basel, Switzerland). 2023;13(11):1898. doi: 10.3390/diagnostics13111898.

98. Nelson D. R., Gonzalez-Peralta R. P., Qian K., Xu Y., Marousis C. G., Davis G. L. et al. Transforming growth factor-beta 1 in chronic hepatitis C. Journal of Viral Hepatitis. 1997;4(1):29-35. doi: 10.1046/j.1365-2893.1997.00124.x.

99. Neuman M. G., Benhamou J. P., Malkiewicz I. M., Ibrahim A., Valla D. C., Martinot-Peignoux M. et al. Kinetics of serum cytokines reflect changes in the severity of chronic hepatitis C presenting minimal fibrosis. Journal of Viral Hepatitis. 2002;9(2):134–140. doi: 10.1046/j.1365-2893.2002.00343.x.

100. Nicastro E., Ranucci G., Vajro P., Vegnente A., Iorio R. Re-evaluation of the diagnostic criteria for Wilson disease in children with mild liver disease. Hepatology. 2010;52(6):1948-56. doi: 10.1002/hep.23910.

101. O'Brien M., Reilly M., Sweeney B., Walsh C., Hutchinson M. Epidemiology of Wilson's disease in Ireland. Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society. 2014;29(12):1567-8. doi: 10.1002/mds.25983.

102. Ovchinnikova E.V., Garbuz M.M., Ovchinnikova A.A., Kumeiko V.V. Epidemiology of Wilson's Disease and Pathogenic Variants of the ATP7B Gene Leading to Diversified Protein Disfunctions. International Journal of Molecular Sciences. 2024;25(4):2402. doi: 10.3390/ijms25042402.

103. Palekar N.A., Naus R., Larson S. P., Ward J., Harrison S.A. Clinical model for distinguishing nonalcoholic steatohepatitis from simple steatosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver. 2006;26(2):151-6. doi: 10.1111/j.1478-3231.2005.01209.x.

104. Panagiotakaki E., Tzetis M., Manolaki N., Loudianos G., Papatheodorou A., Manesis E. et al. Genotype-phenotype correlations for a wide spectrum of mutations in the Wilson

disease gene (ATP7B). American Journal of Medical Genetics. Part A. 2004;131(2):168-73. doi: 10.1002/ajmg.a.30345.

105. Ranucci G., Socha P., Iorio R. Wilson disease: what is still unclear in pediatric patients? Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology. 2014;38(3):268-72. doi: 10.1016/j.clinre.2014.03.002.

106. Roberts E. A., Socha P. Wilson disease in children. Handbook of Clinical Neurology. 2017;142:141-156. doi: 10.1016/B978-0-444-63625-6.00012-4.

107. Roehlen N., Crouchet E., Baumert T.F. Liver Fibrosis: Mechanistic Concepts and Therapeutic Perspectives. Cells. 2020;9(4):875. doi: 10.3390/cells9040875.

108. Roy S., McCann C.J., Ralle M., Ray K., Ray J., Lutsenko S. et al. Analysis of Wilson disease mutations revealed that interactions between different ATP7B mutants modify their properties. Scientific Reports. 2020;10(1):13487. doi: 10.1038/s41598-020-70366-7.

109. Ryan A., Nevitt S.J., Tuohy O., Cook P. Biomarkers for diagnosis of Wilson's disease. The Cochrane Database of Systematic Reviews. 2019;2019(11):CD012267. doi: 10.1002/14651858.CD012267.pub2.

110. Samadzadeh S., Kruschel T., Novak M., Kallenbach M., Hefter H. Different Response Behavior to Therapeutic Approaches in Homozygotic Wilson's Disease Twins with Clinical Phenotypic Variability: Case Report and Literature Review. Genes. 2022;13(7):1217. doi: 10.3390/genes13071217.

111. Sandahl T.D., Laursen T.L., Munk D.E., Vilstrup H., Weiss K.H., Ott P. The Prevalence of Wilson's Disease: An Update. Hepatology. 2020;71(2):722-732. doi: 10.1002/hep.30911.

112. Sapuppo A., Pavone P., Praticò A.D., Ruggieri M., Bertino G., Fiumara A. Genotype-phenotype variable correlation in Wilson disease: clinical history of two sisters with the similar genotype. BMC medical genetics. 2020;21(1):128. doi: 10.1186/s12881-020-01062-6.

113. Schilsky M. L., Roberts E.A., Bronstein J.M, Dhawan A., Hamilton J.P., Rivard A.M. et al. A multidisciplinary approach to the diagnosis and management of Wilson disease: 2022 Practice Guidance on Wilson disease from the American Association for

the Study of Liver Diseases. Hepatology. 2023;77(4):1428-1455. doi: 10.1002/hep.32805.

114. Seo J.K. Diagnosis of Wilson disease in young children: molecular genetic testing and a paradigm shift from the laboratory diagnosis. Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition. 2012;15(4):197-209. doi: 10.5223/pghn.2012.15.4.197.

115. Sezer O.B., Perk P., Hoşnut F.Ö., Köse S.K., Özcay F. Is it necessary to re-evaluate diagnostic criteria for Wilson disease in children? The Turkish Journal of Gastroenterology: The Official Journal of Turkish Society of Gastroenterology. 2014;25(6):690-695. doi: 10.5152/tjg.2014.7787.

116. Shribman S., Marjot T., Sharif A., Vimalesvaran S., Ala A., Alexander G. et al. Investigation and management of Wilson's disease: a practical guide from the British Association for the Study of the Liver. The Lancet. Gastroenterology & Hepatology. 2022;7(6):560-575. doi: 10.1016/S2468-1253(22)00004-8.

117. Simashkova N.V. Ivanov M.V. Makushkin E.V. Sharlay I.A. Klyushnik T.P. Kozlovskaya G.V. Skrining riska vozniknoveniya narushenii psikhicheskogo razvitiya u detei rannego vozrasta (dannye po 9 regionam Rossii v 2017–2019 gg.) [Screening of the risk of mental and developmental disorders in children of early age in the Russian population (2017–2019)]. Z. Nevrol. Psikhiatrii Im. S.S. Korsakova 2020;120(11):79–86. doi:10.17116/jnevro202012011179.

118. Sini M., Sorbello O., Civolani A., Liggi M., Demelia L. Non-invasive assessment of hepatic fibrosis in a series of patients with Wilson's Disease. Digestive and Liver Disease. 2012;44(6):487-91. doi: 10.1016/j.dld.2011.12.010.

119. Sipilä J.O.T., Kytövuori L., Kaasinen V. Clinical spectrum and genotype-phenotype associations in Finnish patients with Wilson's disease. Journal of the Neurological Sciences. 2023;448:120620. doi: 10.1016/j.jns.2023.120620.

120. Socha P., Janczyk W.,Dhawan A., Baumann U., D'Antiga L.,Tanner S. et al. Wilson's Disease in Children: A Position Paper by the Hepatology Committee of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition. 2018;66(2):334-344. doi: 10.1097/MPG.0000000000001787.

121. Song Y.M., Chen M.D. A single determination of liver copper concentration may misdiagnose Wilson's disease. Clinical Biochemistry. 2000;33(7):589-90. doi: 10.1016/s0009-9120(00)00164-8.

122. Stättermayer A.F., Traussnigg S., Dienes H-P., Aigner E.,Stauber R., Lackner K. et al. Hepatic steatosis in Wilson disease--Role of copper and PNPLA3 mutations. Journal of Hepatology. 2015;63(1):156-63. doi: 10.1016/j.jhep.2015.01.034.

123. Stefanescu A.C., Pop T.L., Stefanescu H., Miu N. Transient elastography of the liver in children with Wilson's disease: Preliminary results. Journal of clinical ultrasound: JCU. 2016;44(2):65-71. doi: 10.1002/jcu.22281.

124. Tomić A., Dobricić V., Novaković I., Svetel M., Pekmezović T.,Kresojević N. et al. Mutational analysis of ATP7B gene and the genotype-phenotype correlation in patients with Wilson's disease in Serbia. Vojnosanitetski Pregled. 2013;70(5):457-62. doi: 10.2298/vsp1305457t.

125. Tsuchida T., Friedman S. L. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology. 2017;14(7):397-411. doi: 10.1038/nrgastro.2017.38.

126. Ucar F., Sezer S., Ginis Z., Ozturk G., Albayrak A.,Basar O. et al. APRI, the FIB-4 score, and Forn's index have noninvasive diagnostic value for liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B. European Journal of Gastroenterology & Hepatology. 2013;25(9):1076-81. doi: 10.1097/MEG.0b013e32835fd699.

127. Velez-Pardo C., Jimenez Del Rio M., Moreno S., Ramírez-Gomez L., Correa G.,Lopera F. New mutation (T1232P) of the ATP-7B gene associated with neurologic and neuropsychiatric dominance onset of Wilson's disease in three unrelated Colombian kindred. Neuroscience Letters. 2004;367(3):360-4. doi: 10.1016/j.neulet.2004.06.032.

128. Wiernicka A., Dądalski M.,Jańczyk W., Kamińska D., Naorniakowska M., Hüsing-Kabar A. et al. Early Onset of Wilson Disease: Diagnostic Challenges. Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition. 2017;65(5):555-560. doi: 10.1097/MPG.0000000000001700.

129. Wilson D. C., Phillips M. J., Cox D. W., Roberts E. A. Severe hepatic Wilson's disease in preschool-aged children. The Journal of Pediatrics. 2000;137(5):719-22. doi: 10.1067/mpd.2000.108569.

130. Wungjiranirun M., Sharzehi K. Wilson's Disease. Seminars in Neurology. 2023;43(4):626-633. doi: 10.1055/s-0043-1771465.

131. Xia J.K., Ning H.F., Luo X., Zeng Y., Chen Y. B., Kong X.D. [Genotype-phenotype relationship and genetics study of 115 cases with Wilson's disease]. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi = Zhonghua Ganzangbing Zazhi = Chinese Journal of Hepatology. 2024;32(6):558-562. doi: 10.3760/cma.j.cn501113-20240416-00208.

132. Xie J., Yang Y., Gao Y., He J. Cuproptosis: mechanisms and links with cancers. Molecular Cancer. 2023;22(1):46. doi: 10.1186/s12943-023-01732-y.

133. Xu R., Jiang Y-F., Zhang Y.-H., Yang X. The optimal threshold of serum ceruloplasmin in the diagnosis of Wilson's disease: A large hospital-based study. PloS One. 2018;13(1):e0190887. doi: 10.1371/journal.pone.0190887.

134. Yahata S., Yung S., Mandai M., Nagahara T., Kuzume D., Sakaeda H. et al. Phenotypes and Chronic Organ Damage May Be Different among Siblings with Wilson's Disease. Journal of Clinical and Translational Hepatology. 2017;5(1):27-30. doi: 10.14218/JCTH.2016.00064.

135. Yamaguchi H., Nagase H., Tokumoto S., Tomioka K., Nishiyama M., Takeda H. et al. Prevalence of Wilson disease based on genome databases in Japan // Pediatrics International: Official Journal of the Japan Pediatric Society. 2021;63(8):918-922. doi: 10.1111/ped.14565.

136. Yang X., Tang X-p., Zhang Y-h. , Luo K-z., Jiang Y-f., Luo H-y. et al. Prospective evaluation of the diagnostic accuracy of hepatic copper content, as determined using the entire core of a liver biopsy sample. Hepatology (Baltimore, Md.). 2015;62(6):1731-1741. doi: 10.1002/hep.27932.

137. Yoshida S., Ikenaga N., Liu S.B., Peng Z-W., Chung J., Sverdlov D.Y. et al. Extrahepatic platelet-derived growth factor-β, delivered by platelets, promotes activation of hepatic stellate cells and biliary fibrosis in mice.Gastroenterology. 2014;147(6):1378-1392. doi: 10.1053/j.gastro.2014.08.038.

138. Zali N., Mohebbi S.R., Esteghamat S., Chiani M., Haghighi M.M., Hosseini-Asl S. M-K. et al. Prevalence of ATP7B Gene Mutations in Iranian Patients With Wilson Disease. Hepatitis Monthly. 2011;11(11):890-894. doi: 10.5812/kowsar.1735143X.762.

139. Zhang B.-B., Cai W.-M., Weng H.-L., Hu Z.-R., Lu J., Zheng M. et al.. Diagnostic value of platelet derived growth factor-BB, transforming growth factor-beta1, matrix metalloproteinase-1, and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in serum and peripheral blood mononuclear cells for hepatic fibrosis. World Journal of Gastroenterology. 2003;9(11):2490-2496. doi: 10.3748/wjg.v9.i11.2490.

140. Zhou J., Deng Y., Yan L., Zhao H., Wang G. Serum platelet-derived growth factor BB levels: a potential biomarker for the assessment of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B. International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases. 2016;49:94-99. doi: 10.1016/j.ijid.2016.06.004.

141. Zhou J., Zhang Q., Zhao Y., Chen M., Zhou S. Cheng Y. Early Diagnosis of Wilson's Disease in Children in Southern China by Using Common Parameters. Frontiers in Genetics. 2022;10:13:788658. doi: 10.3389/fgene.2022.788658.

142. Zischka H., Einer C. Mitochondrial copper homeostasis and its derailment in Wilson disease. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2018:102:71-75. doi: 10.1016/j.biocel.2018.07.001.

143. 8th International Conference on Wilson Disease and Menkes Disease. Leipzig, Germany, April 16-18, 2001. Abstracts. Zeitschrift Fur Gastroenterologie. 2001;39(3):245-60.

144. Клинические рекомендации РФ «Нарушение обмена меди» [Электронный ресурс]. URL: https://cr.minzdrav.gov.ru/preview-cr/376_3 (дата обращения: 25.01.2026).