

*На правах рукописи*

**БАЛАШОВА МАРИЯ СЕРГЕЕВНА**

**ОЦЕНКА СПЕКТРА МУТАЦИЙ ГЕНА *ATP7B*  
И КЛИНИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА БОЛЕЗНИ  
ВИЛЬСОНА-КОНОВАЛОВА**

**03.02.07 – Генетика**

**14.01.04 – Внутренние болезни**

**Автореферат диссертации  
на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук**

**Москва – 2019**

Работа выполнена на кафедре медицинской генетики лечебного факультета Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

**Научные руководители:**

**доктор медицинских наук, профессор**

**Асанов Алий Юрьевич**

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), кафедра медицинской генетики лечебного факультета, заведующий кафедрой

**доктор медицинских наук**

**Игнатова Татьяна Михайловна**

Многопрофильная клиника "Центр эндохирургии и литотрипсии", врач-гастроэнтеролог

**Официальные оппоненты:**

**доктор медицинских наук, профессор**

**Петрин Александр Николаевич**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория молекулярно-генетических исследований, ведущий научный сотрудник

**доктор медицинских наук**

**Винницкая Елена Владимировна**

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Московский клинический научный центр имени А.С. Логинова Департамента здравоохранения города Москвы», отдел гепатологии, заведующая отделом

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 года на заседании Диссертационного совета Д.208.072.16 на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации» по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, 1

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, 1  
Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
доктор медицинских наук, доцент

Ларина Вера Николаевна

## Актуальность исследования

Болезнь Вильсона-Коновалова (БВК, гепатоцеребральная дегенерация) – наследственное заболевание, в основе которого лежит нарушение обмена меди, приводящее к избыточному накоплению ее в печени, головном мозге, роговице и других органах. Заболевание возникает вследствие мутаций гена *ATP7B*, кодирующего белок-транспортер меди АТФазу-7В. При БВК нарушается способность дефектной АТФазы-7В к транспортировке меди в лизосомы и включению ее в церулоплазмин, в связи с чем снижается уровень церулоплазмينا в крови и нарушается экскреция меди с желчью.

По данным современных исследований, БВК встречается намного чаще, чем считалось ранее: около 1:7000-10000 вместо 1:30000 (Coffey A.J., 2013, Vandmann, O., 2015). Заболевание характеризуется манифестацией преимущественно в молодом возрасте, широким спектром клинических проявлений (от гепатита и цирроза печени до неврологических расстройств и других внепеченочных симптомов), значительной вариабельностью клинического течения и тяжелым прогнозом. Полиморфизм и неспецифичность симптомов, а также отсутствие у части больных снижения уровня церулоплазмينا и/или отложения меди в роговице обуславливают значительные трудности своевременной диагностики БВК (Roberts, E.A., 2008, Ferenci, P., 2017)

В то же время, БВК – одно из немногих генетических заболеваний, для которых разработана эффективная патогенетическая терапия. Своевременная диагностика и проведение медьэлиминирующей терапии позволяет радикально изменить прогноз. Молекулярно-генетическое тестирование все более широко внедряется в клиническую практику в качестве метода, позволяющего помочь своевременно диагностировать БВК, в том числе на доклинической стадии.

К настоящему времени у больных БВК из большого числа популяций мира идентифицировано более 800 различных мутаций в гене *ATP7B*. В разных этнических группах спектр мутаций указанного гена у больных имеет свои особенности. Для Европы и европейской части России мажорной мутацией является Н1069Q (p.His1069Gln) в 14 экзоне (Иллариошкин С.Н, 2004; Ferenci P., 2006; Kucinskas L., 2008). Наиболее часто российские исследователи проводят поиск частых мутаций у пациентов с БВК. Объем стандартного генетического исследования имеет тенденцию к расширению. Подбор частых

мутаций сформирован на основании исследования «горячих» экзонов гена *ATP7B* (14, 15, 16 и 18-й) у пациентов, происходящих в основном из европейской части России. Прямое секвенирование гена *ATP7B* до недавнего времени проводилось в крайне редких случаях, так как было сопряжено с большими финансовыми затратами. Современные возможности значительно расширились с появлением методов NGS (Next Generation Sequencing), которые обладают высокой информативностью и существенно более низкой стоимостью. В России сплошных исследований больных БВК с применением данного метода до настоящего времени не проводились. Кроме того, остаются недостаточно изученными генотип-фенотип корреляции при БВК, а результаты имеющихся исследований по данному вопросу противоречивы (Гуляева, С.Е., 2013, Карнаус, А.С., 2009, Stapelbroek J.M., 2004). Таким образом, спектр мутаций гена *ATP7B* в России требует дальнейшего изучения с целью определения частоты известных мутаций и выявления новых, характерных для различных популяций. Актуально также изучение полиморфизма клинической картины БВК и потенциального влияния генотипа на клинические проявления заболевания. В комплексе это обеспечит научную базу для формирования персонализированного подхода в ведении больного БВК.

#### **Цель исследования:**

Оценить спектр мутаций гена *ATP7B* и проанализировать их возможную связь с развитием клинического полиморфизма при БВК.

#### **Задачи исследования:**

1) На основании молекулярно-генетического исследования (таргетное NGS) определить частоту и спектр мутаций в гене *ATP7B* у пациентов с БВК и их родственников.

2) Оценить частоту гетерозиготного носительства мутаций в гене *ATP7B* в группе контроля с помощью полноэкзомного секвенирования методом NGS.

3) Изучить особенности клинических проявлений у пациентов с БВК.

4) Провести анализ связи тяжести течения с типом мутации и ее патогенетического эффекта.

#### **Научная новизна**

Впервые проведено комплексное обследование российских пациентов с БВК, включающее поиск мутаций гена *ATP7B* методом NGS и всестороннее

изучение клинической картины; изучен клинический полиморфизм БВК, в том числе внутрисемейный.

Впервые в России проведено секвенирование гена *ATP7B* методом таргетного NGS у 81 пациента с БВК. Секвенирование гена *ATP7B* позволило обнаружить 31 мутацию, включая редкие и ранее не описанные мутации. Наиболее частыми мутациями явились с.3207C>A (48% аллелей) и с.3190G>A (7% аллелей). Обнаружены 3 ранее не описанные потенциально патогенные мутации - с.1870-8A>G, с.1971dupC, с.3036dupC.

Впервые проведено сравнение спектра патогенных и непатогенных вариантов в гене *ATP7B* среди пациентов с БВК и в группе контроля (здоровые люди).

Впервые проведено исследование связи тяжести течения БВК с типом мутации с использованием группировки пациентов по принципу влияния мутации на белковый продукт.

### **Практическая значимость исследования**

Работа обосновывает значимость и перспективу внедрения современного молекулярно-генетического метода исследования (таргетное NGS) для ранней диагностики БВК. Оценена эффективность метода для ранней диагностики БВК и для медико-генетического консультирования семей больных с различными формами БВК. Данный подход позволяет выявить до 98% мутантных аллелей, что позволяет своевременно диагностировать заболевание и назначить патогенетическую терапию. Это, в свою очередь, способствует улучшению прогноза для пациентов с БВК.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Большинство пациентов БВК компаунд-гетерозиготны. Наиболее частой мутацией в Российской популяции больных явилась мутация с.3207C>A (p.His1069Gln) - на 51,85% аллелей и у 72,9% обследованных. Второй и третьей по частоте оказались мутации с.3190G>A (p.Glu1064Lys) и с.3402delC (p.Ala1135fs) – на них пришлось по 8,64% и 6,17% аллелей соответственно.
2. Частота гетерозиготного носительства мутаций в гене *ATP7B* в группе здоровых лиц составила 1:89; выявлена мутация с.3207C>A (p.His1069Gln), носительство других мутаций не было обнаружено.

3. Клиническая картина БВК характеризуется значительным полиморфизмом: от бессимптомного течения до развития фульминантного гепатита, декомпенсированного цирроза печени или тяжелого поражения ЦНС с манифестацией в возрасте от 5 до 45 лет. Отмечается позднее распознавание БВК – в среднем через 34 месяца (максимально – 180 месяцев) после появления первых симптомов, нередко на стадии декомпенсированного цирроза печени (34,5% больных), что ухудшает прогноз.
4. Современное молекулярно-генетическое исследование, применяемое как при подозрении на заболевание, так и при медико-генетическом консультировании в семьях больных БВК, упрощает раннюю диагностику заболевания и позволяет своевременно назначить патогенетическую терапию. Внедрение в практику метода NGS в будущем позволит значительно увеличить информативность исследования и улучшить диагностику и прогноз БВК.
5. При исследовании связи генотипов и тяжести болезни Вильсона-Коновалова прослеживается общая, оцененная по результатам различных подходов и исследованным параметрам, тенденция, указывающая на более тяжелое течение БВК при мутациях, потенциально приводящих к значительным нарушениям процессинга белка – nonsense, frameshift, splicing мутации.

#### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

В соответствии с формулами специальности:

«03.02.07 – Генетика (медицинские науки)», охватывающей проблемы изменчивости и наследственности, закономерности процессов хранения, передачи и реализации генетической информации на молекулярном, клеточном, организменном и популяционном уровнях в области «Генетика человека. Медицинская генетика. Наследственные болезни».

14.01.04 - Внутренние болезни (медицинские науки), изучающей этиологию, патогенез, семиотику, диагностику, прогноз и профилактику заболеваний внутренних органов в области «Совершенствование лабораторных, инструментальных и других методов обследования терапевтических больных, совершенствование диагностической и дифференциальной диагностики болезней внутренних органов».

## **Апробация работы**

Материалы диссертации доложены: на внутренней межкафедральной конференции в Клинике ревматологии, нефрологии и профпатологии им. Е.М. Тареева (г. Москва) «Формальная генетика и молекулярно-генетические основы болезни Вильсона-Коновалова» 11 марта 2015 г.; на конгрессе «Гепатология сегодня» 17-19 марта 2017 (г. Москва); в стендовом докладе European Human Genetics Conference 2017 (Copenhagen, Denmark) May 27-30 2017; на конференции «Клиническая протеомика. Постгеномная медицина» 30 октября - 1 ноября 2017(г. Москва); XI Научной конференции «Генетика человека и патология» 27-30 ноября 2017 года (г. Томск); на конгрессе «Гепатология сегодня 23-25 марта 2018 (г. Москва); в стендовом докладе European Human Genetics Conference 2018 (Milan, Italy) June 18-20 2018. Работа апробирована и рекомендована к защите на совместном заседании сотрудников кафедры медицинской генетики ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и кафедры терапии Института последипломного профессионального образования ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, протокол №12 от «02» июля 2018 г.

## **Личный вклад автора в проведение исследования**

Автор непосредственно участвовала в разработке самой идеи, формулировании цели и задач, выборе методов исследования, обработке медицинского и статистического материала, организации и проведении клинического этапа исследования, анализе и интерпретации полученных данных, а также в подготовке публикаций по диссертационной теме.

Автором лично проведен осмотр пациентов с БВК и членов их семей, заполнение медицинских карт. Автором детально изучена и проработана отечественная и зарубежная литература по теме диссертации, проведен статистический анализ данных, сформулированы результаты и выводы. Результаты исследования опубликованы в рецензируемых журналах и доложены на научных конференциях.

## **Публикации**

По результатам диссертации опубликовано 12 печатных работ соискателя, в том числе 4 статьи (3 статьи - в журналах, рекомендованных ВАК МОН РФ для соискателей ученой степени кандидата медицинских наук, из

которых 2 – в журналах, индексируемых PubMed и Scopus, а также 1 статья - в зарубежном журнале, индексируемом Web of Science).

### **Структура и объём диссертации**

Диссертация имеет следующую структуру: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты, обсуждение, перспективы дальнейшей разработки темы исследования, заключение, выводы, практические рекомендации, список литературы и приложение. Работа представлена на 135 страницах машинописного текста, содержит 21 таблицу и 17 рисунков. Библиографический указатель включает 212 наименований, из них 28 отечественных и 184 иностранных источников.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материал и методы исследования**

Работа основана на изучении 81 больного БВК и 10 их ближайших родственников, обращавшихся первично или для динамического наблюдения в Клинику ревматологии, нефрологии и профпатологии им. Е.М. Тареева в 2014-2015 гг. Средний возраст больных БВК на момент обследования составил  $29,21 \pm 6,5$  (от 8 до 68 лет), соотношение по полу (м/ж) – 1:2,5. Большинство пациентов происходили из Центрального федерального округа РФ (73,4%).

В контрольную группу вошло 178 человек, не страдающих БВК и не имеющих отягощенного семейного анамнеза по данной патологии. В качестве группы контроля были обследованы здоровые доноры половых клеток в ООО «ЦГРМ «ГЕНЕТИКО». Средний возраст в контрольной группе составил  $28,7 \pm 4,2$  (от 22 до 35 лет). Соотношение по полу (м/ж) составило 2,8/1. В связи с преобладанием доноров сперматозоидов гендерный состав основной и контрольной группы отличается, однако, это не имеет значения в связи с тем, что БВК наследуется по аутосомно-рецессивному типу и носительство мутаций в гене *ATP7B* не зависит от пола.

Диагноз БВК в основной группе устанавливался в соответствии с Европейскими и Российскими клиническими рекомендациями с использованием Лейпцигской балльной шкалы (Асанов, А.Ю., 2013, Ferenci P., 2012)



Все пациенты прошли обследование, состоящее из нескольких этапов: 1. Медико-генетическое консультирование; 2. Ретроспективный анализ информации, содержащейся в историях болезни, анализ клинико-лабораторных данных, включавших данные клинического анализа крови и мочи, биохимического анализа крови (сывороточные аминотрансферазы, белковые фракции, липидный профиль, показатели обмена меди и железа); 3. Молекулярно-генетическое исследование проводилось на базе лаборатории пренатальной диагностики наследственных и врожденных заболеваний человека ФГБНУ «НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта» (Санкт-Петербургский государственный университет). Проводился забор периферической крови в пробирки с ЭДТА. Выделение ДНК из лимфоцитов периферической цельной крови проводилось с использованием набора QIAamp DNA BloodMiniKit.

С целью молекулярно-генетической диагностики БВК была разработана таргетная NGS-панель, включающая ген *ATP7B* и ряд потенциальных генов-модификаторов: *HFE*, *COMMD1*, *XIAP*, *CFTR*, *APOE*, *PRNP* (Nimble GenSeqCapEZChoice: 151012\_HG38\_CysFib\_EZ\_HX3 (ROCHE)). Определение последовательности выбранных генов проводилось с использованием системы высокопроизводительного полногеномного секвенирования MiSeq Sequencing System (Illumina). При этом исследовались все экзоны гена, а также фланкирующие последовательности интронов приблизительно на 50 п.о. Технология Illumina основана на массивном параллельном секвенировании миллионов одноцепочечных фрагментов ДНК (образующих колонии молекулярных кластеров) с помощью флуоресцентно-меченных нуклеотидов, комплементарно встраивающихся в растущую вторую цепь. Дизайн панели зондов, комплементарных одной цепи ДНК, осуществляется в программе DesignStudio (Illumina). Для подготовки библиотек использовался набор Nextera DNA Sample Preparation Kit (Illumina). Для интерпретации полученных данных использовались критерии, предложенные в Руководстве по интерпретации данных, полученных методами MPS (Рыжкова, О.П., 2017). Выявленные варианты классифицировались как патогенные, вероятно патогенные, неопределенного значения, вероятно доброкачественные и доброкачественные. Кроме этого, использовалась база данных мутаций гена *ATP7B* Университета Альберты (<http://www.wilsondisease.med.ualberta.ca>).

Для подтверждения 5-ти наиболее частых мутаций, выявленных методом NGS (c.2304dupC (p.Met769fs), c.3402delC (p.Ala1135fs), c.3649\_3654 delGTTCTG, c.3190G>A (p.Glu1064Lys), c.3207C>A (p.His1069Gln)), использовались полимеразная цепная реакция (ПЦР) и ПЦР-ПДРФ анализ.

В ходе исследования использовались стандартные методики статистического анализа. Для статистической обработки данных использован пакет прикладных статистических программ «IBM SPSS Statistics», а также программа Microsoft Excel. Для оценки взаимосвязи между генотипом и клиническими проявлениями БВК использовались критерий случайного распределения Пирсона (хи-квадрат), и коэффициент корреляции Спирмена.

## Результаты

### Спектр и частота мутаций в гене *ATP7B* у пациентов с БВК и их родственников

Обнаружен 31 патогенный вариант гена *ATP7B*. Перечень и характеристика обнаруженных патогенных вариантов, а также количество выявленных аллелей приведены в таблице 1.

Таблица 1. Перечень и аллельные частоты мутаций гена *ATP7B*, выявленных при обследовании основной группы пациентов.

Домен	Экзон	Вариант	Эффект	N выявленных аллелей	процент	Описана ранее как патогенная при БВК
Металл-связывающий	2	c.331C>T (p.Gln111*)	stop	3	1,85%	Да
	4	c.1630C>T (p.Gln544*)	stop	1	0,62%	Да
Транс-мембранный	6	c.1870-8A>G	splicing	1	0,62%	Нет
	7	c.1969A>C (p.Ser657Arg)	missense	1	0,62%	Да
		c.1971dupC (p.Met658fs)	frameshift	1	0,62%	Нет
		c.2121+3A>G	splicing	1	0,62%	Да
	8	c.2128G>A (p.Gly710Ser)	missense	1	0,62%	Да
		c.2293G>A (p.Asp765Asn)	missense	1	0,62%	Да
c.2304dupC		frameshift	8	4,94%	Да	

		(p.Met769fs)	t			
		c.2332C>G (p.Arg778Gly)	missense	4	2,47%	Да
		c.2336G>A (p.Trp779*)	stop	1	0,62%	Да
Фосфатазный	11	c.2605G>T (p.Gly869*)	stop	1	0,62%	Да
Транс- мембранный	13	c.2998G>A (p.Gly1000Arg)	missense	1	0,62%	Да
		c.3036dupC (p.Lys1013fs)	frameshift	2	1,23%	Нет
Фосфорилиру- ющий	14	c.3190G>A (p.Glu1064Lys)	missense	14	8,64%	Да
		c.3207C>A (p.His1069Gln)	missense	84	51,85%	Да
Транс- мембранный	15	c.3402delC (p.Ala1135fs)	frameshift	10	6,17%	Да
	16	c.3556+1G>T	splicing	1	0,62%	Да
АТФ- связывающий	17	c.3098C>T(p.Thr1033Ile)	missense	1	0,62%	Да
		c.3646G>A (p.Val1216Met)	missense	1	0,62%	Да
		c.3649_3654del GTTCTG (p.Val1217_Leu1218del)	indel	7	4,32%	Да
		c.3655A>T (p.Ile1219Phe)	missense	1	0,62%	Нет
		c.3659C>T (p.Thr1220Met)	missense	1	0,62%	Да
Фосфорилиру- ющий	18	c.3809A>G (p.Asn1270Ser)	missense	1	0,62%	Да
Транс- мембранный	19	c.3948delG (p.Thr1317fs)	frameshift	1	0,62%	Да
		c.3955C>T (p.Arg1319*)	Stop	1	0,62%	Да
		c.3965G>C (p.Arg1322Pro)	missense	1	0,62%	Да
С-конец (стабилизиру- ющая функция)	20	c.4022G>A (p.Gly1341Asp)	missense	1	0,62%	Да
		c.4125-2A>G	splicing	4	2,47%	Да

NGS позволил выявить мутации на обеих хромосомах у 96% больных и на 98% аллелей. У 4% пациентов (2% аллелей) кандидатных мутаций не было обнаружено, несмотря на развернутую клиническую картину БВК. По данным литературы, до 10-20% мутаций гена *ATP7B* может быть представлено

протяженными внутригенными делециями, инсерциями или дупликациями, которые не распознаются секвенированием (Członkowska, A., 2017). В связи с этим в дальнейшем планируется провести исследование на наличие подобных мутаций у этих пациентов с помощью метода MLPA.

В большинстве случаев были выявлены две наиболее частые мутации с.3190G>A (p.Glu1064Lys) и с.3207C>A (p.His1069Gln) в экзоне 14. Мажорная мутация с.3207C>A (p.His1069Gln) встретилась на 51,85% аллелей, что согласуется с данными других исследований генетических особенностей БВК в России и Восточной Европе (Дубовик С.В, 2010; Иллариошкин С.Н., 2012; Карнаус А.С., 2009; Chabik G., 2014; Ferenci P., 2006). Второй по частоте (8,64% аллелей) оказалась мутация с.3190G>A (p.Glu1064Lys), которая ранее не включалась в число частых. Вероятно, это связано с тем, что данная мутация расположена в непосредственной близости от мажорной мутации с.3207C>A (p.His1069Gln), что может мешать прямой диагностике методом ПЦР. На третьем месте по частоте оказалась мутация с.3402delC (p.Ala1135fs) на которую пришлось 6,17% мутантных аллелей (рисунок 1).

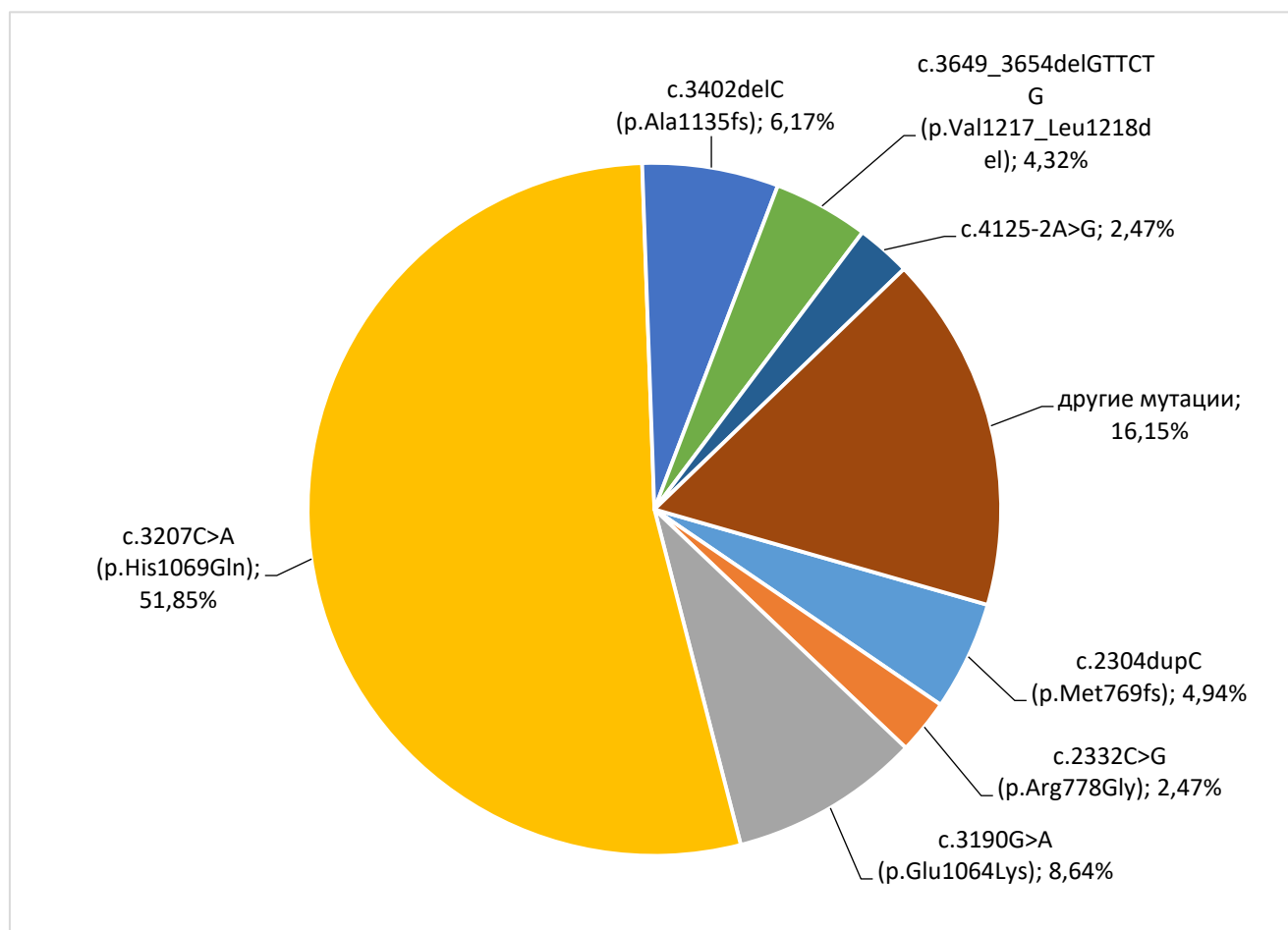


Рисунок 1. Спектр мутаций гена *ATP7B*

Мутация с.3207C>A (p.His1069Gln) обнаружилась у 72,9% обследованных. При этом только у 28,2% она присутствовала в гомозиготной форме, в то время как у остальных 44,7% обследованных данная замена была выявлена в компаунд-гетерозиготной форме. Среди остальных мутаций только с.3190G>A (p.Glu1064Lys) обнаружилась в гомозиготной форме – у 1 пациентки. Таким образом, большинство пациентов (72,5%) оказались компаунд-гетерозиготны, что согласуется с литературными данными (Иллариошкин, С.Н., 2002).

В 16,15% случаев были обнаружены единичные редкие мутации гена *ATP7B*. Мутации с.1870-8A>G, с.3655A>T (p.Phe1219Phe), с.3036dupC (p.Lys1013fs) ранее не были описаны в литературе как приводящие к БВК:

- Вариант с.1870-8A>G находится в каноничном сайте сплайсинга и расценивается как патогенный программой fathmm-MKL. В этом положении в базе данных Университета Альберты описаны варианты с.1870-23A>C, с.1870-2A>G и с.1870-2delA.
- Вариант с.3655A>T (p.Phe1219Phe) приводит к замене изолейцина на фенилаланин. Вариант рассматривается как патогенный программами SIFT и Polyphen2b и как нейтральный программой PROVEAN.
- Вариант с.3036dupC (p.Lys1013fs) приводит к сдвигу рамки считывания. В этом положении в базе данных Университета Альберты описан вариант с.3036C>G, приводящий к образованию стоп-кодона и обрыву синтеза белка.

Впоследствии планируется подтвердить наличие мутаций методом прямого автоматического секвенирования по Сэнгеру, а их патогенность – с помощью сегрегационного анализа в семьях больных.

По своему эффекту мутации распределились следующим образом: 14,0% аллелей - фреймшифт, 4,0% - нонсенс, 73,3% – миссенс, 4,7% – мутации сайтов сплайсинга, 4,0% - индел. Мутации обнаружались во всех экзонах гена *ATP7B*, кроме 1, 3, 5, 9, 10, 12 и 21. На рисунке 2 представлено распределение выявленных патогенных вариантов по экзонам и доменам гена *ATP7B*.

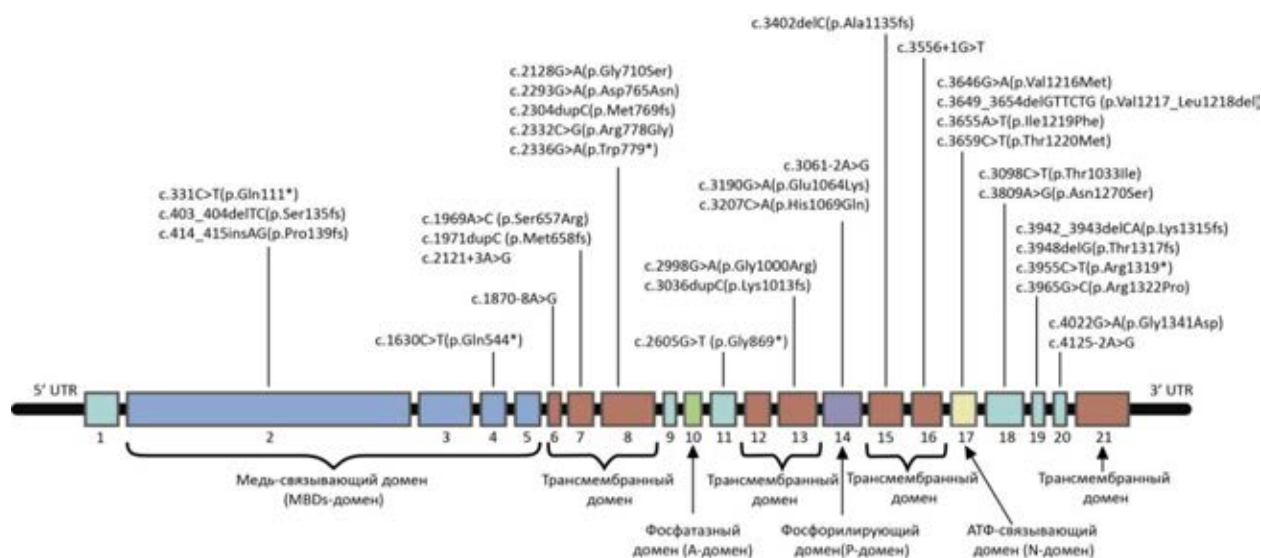


Рисунок 2. Распределение выявленных мутаций по гену *ATP7B*

На большинстве аллелей присутствовали патогенные варианты в 14 экзоне (96 аллелей). Наибольшее количество отдельных мутаций было обнаружено в экзонах 7, 8, 17 и 19, что позволяет также считать их «горячими точками» при анализе гена *ATP7B*. Большинство мутаций располагались в экзонах, кодирующих трансмембранный, фосфорилирующий и АТФ-связывающий домены белка.

Проведено подтверждение мутаций, которые встречались среди обследованных пациентов наиболее часто: c.2304dupC (p.Met769fs), c.3402delC (p.Ala1135fs), c.3649\_3654delGTTCTG, c.3190G>A (p.Glu1064Lys), c.3207C>A (p.His1069Gln). Во всех случаях результаты подтверждающего тестирования соответствовали результатам NGS.

При обследовании родственников пациентов с БВК в 2 случаях были выявлены мутации в гомозиготной и компаунд-гетерозиготной форме у сибсов больных БВК, что позволило своевременно диагностировать заболевание и начать медьэлиминирующую терапию. В 1 случае было выявлено носительство мутации c.3207C>A(p.His1069Gln) в гене *ATP7B* у супруга пациентки с БВК. Тот факт, что при обследовании даже незначительного числа родственников пациентов с БВК в трех случаях были выявлены клинические значимые находки, демонстрирует исключительную важность профилактического

молекулярно-генетического обследования членов семей больных, а не только клинико-биохимического, которое проводится рутинно, но на ранних бессимптомных стадиях оказывается, как правило, недостаточным.

При сравнении спектра выявленных в данном исследовании мутаций с мутациями, входящими в наиболее часто применяющуюся в РФ панель, оказалось, что только 4 мутации из 12 встретились в обследованной выборке пациентов (с.2304insC, с.3207C>A, с.3402delC,с.3649\_3654del6). Кроме того, еще 3 мутации относительно часто встречались среди наших пациентов, но не входили в данную панель (с.2332 C>G (p.Arg778Gly), с.4125-2A>G, с.3190G>A (p.Glu1064Lys)).

Таким образом, NGS показывает себя как эффективный метод для установления генетических причин БВК среди населения Российской Федерации. Использование таргетного NGS с финансовой точки зрения соизмеримо с анализом на частые мутации, однако существенно информативнее. Внедрение в клиническую практику методов массивного параллельного секвенирования позволяет облегчить и ускорить диагностику БВК, и, таким образом, своевременно назначить медьэлиминирующую терапию. Молекулярно-генетическое тестирование показано всем пациентам с поражением печени неясной этиологии.

### **Спектр и частота мутаций в гене *ATP7B* в группе контроля**

При полноэкзомном исследовании в группе контроля было обнаружено 2 случая гетерозиготного носительства мутации с.3207C>A (p.His1069Gln), что соответствует частоте носительства 1:89. Носительства других, более редких патогенных вариантов, выявлено не было. Выявленная частота носительства требует уточнения в связи с относительно небольшим объемом контрольной группы, однако не противоречит данным литературы (Członkowska A., 2017; Jang J.H., 2017; Olivarez L., 2001; Otto P.A., 2016).

### **Анализ непатогенных вариантов в гене *ATP7B***

Был проведен анализ частоты непатогенных вариантов в гене *ATP7B* у пациентов с БВК и их родственников и в группе контроля. Были обнаружены как известные частые доброкачественные варианты с.3419T>C (p.Val1140Ala), с.2855G>A (p.Arg952Lys), с.2495A>G (p.Lys832Arg), с.1216T>G(p.Ser406Ala), с.1366G>C(p.Val456Leu), которые встретились у 55-60% пациентов, так и ранее

не описанные варианты с.1373A>G(p.Glu458Gly), с.419C>G(p.Ala140Gly), с.409T>A(p.Ser137Thr), с.400C>G(p.Pro134Ala), с.2956T>A(p.Ser986Thr). Во всех случаях варианты были выявлены при анализе данных пациентов, у которых уже были обнаружены варианты с доказанной патогенностью.

### **Клиническая характеристика основной группы**

В клинической картине подавляющего большинства (60%) больных преобладали признаки поражения печени. Превалирование абдоминальной формы БВК обусловлено проведением данного исследования на базе терапевтического стационара. У 31% при наличии признаков поражения печени преобладали симптомы поражения ЦНС. 9% больных были обследованы в рамках семейного скрининга как сибсы пациентов с БВК, и не имели никаких клинических проявлений.

Отмечены широкий диапазон возраста манифестации БВК - от 5 до 45 лет (в среднем –  $18,57 \pm 8,2$  лет) и выраженный полиморфизм клинических проявлений, что широко обсуждается и в литературе (Gollan, YL., 1998; Hoogenraad T., 1997; Rodriguez–Castro K.I., 2015).

В дебюте болезни у 20,9% пациентов наблюдалась декомпенсация цирроза печени, у 4,9% – фульминантный гепатит (таким образом, у  $\frac{1}{4}$  больных – тяжелая форма поражения печени в дебюте), у 38,5% – проявления хронического гепатита, у 35,7% – внепеченочная патология. У подавляющего большинства пациентов диагностика БВК была несвоевременной. Только у 33% человек БВК была диагностирована в течение первых трех месяцев после появления первых симптомов. Наиболее часто больные наблюдались с диагнозами «гепатит неуточненной этиологии» и «аутоиммунный гепатит». Средний возраст на момент установления диагноза БВК составил  $23,46 \pm 15,84$  (от 7 до 45 лет). Опоздание диагноза составило в среднем 34 месяца (максимально – 180 месяцев, или 15 лет), что утяжеляло прогноз БВК.

При первичном обследовании 73,3% больных имели стадию цирроза печени (из них 23,9% - декомпенсированный цирроз). Печеночные и внепеченочные проявления БВК при первичном обследовании пациентов представлены соответственно в таблице 2 и 3.



Таблица 2. Частота проявлений поражения печени (n=81)

Гепатомегалия	77,9%
Спленомегалия	47,7%
Желтуха (билирубин >21ммоль/л)	44,9%
Отечно-асцитический синдром	27,1%
Варикозное расширение вен пищевода	24,4%

Таблица 3. Частота внепеченочных проявлений БВК (n=81)

Поражение почек	15,1%
Гемолиз	9,89%
Кольцо Кайзера-Флейшера	72,1%
Тромбоцитопения	59,2%
Артралгия	9,89%
Психиатрические расстройства (депрессивные состояния, тревожность, нарушение сна, перепады настроения)	11,27%
Неврологические расстройства (головные боли, тремор и другие двигательные нарушения, ухудшение памяти, слюнотечение, судороги, нарушение чувствительности)	29,1%
Нарушения менструальной функции	41,3% женщин

При анализе лабораторных показателей следует отметить высокую частоту снижения уровня альбумина (у 32,3%) и холинэстеразы (у 57,5%), что свидетельствовало о нарушении белоксинтетической функции печени. У 42,4% больных отмечалось повышение уровня билирубина как за счет прямой, так и непрямой (вследствие гемолиза!) фракции.

Уровень церулоплазмина крови составил в среднем 0,113 г/л. У 38,7% пациентов наблюдалось снижение церулоплазмина менее 0,1 г/л, у 50% пациентов – от 0,1 до 0,2 г/л, у 11,3% пациентов церулоплазмин был в рамках нормы (более 0,2 г/л). Уровень суточной экскреции меди с мочой в среднем составил 466,75 мкг/сут ( $\pm$  635,82), при этом у 4,6% пациентов этот показатель был в рамках нормы (менее 50 мкг/сут).

При использовании Лейпцигской шкалы без учета данных молекулярно-генетического тестирования почти четверть (24,12%) пациентов в период диагностического поиска попали в категорию (менее 3 баллов) маловероятного диагноза БВК (главным образом, из-за отсутствия значимого снижения

церулоплазмина и кольца Кайзера-Флейшера). Только более подробное обследование, в том числе генетическое тестирование, позволило подтвердить диагноз БВК для этой категории больных. Таким образом, обнаружение мутаций гена *ATP7B* играет важную роль в ранней диагностике БВК.

В значительной части наблюдений (27,2%) была выявлена семейная форма БВК, причем неоднократно (7,4% случаев) поводом для обследования пациентов на БВК послужила смерть sibса. Это подтверждает важность семейного генетического скрининга.

При оценке динамики течения заболевания у 81 пациента с БВК после установления диагноза (длительность наблюдения от 2 до 46 лет, в среднем 5,8 лет) отмечена выраженная эффективность медьэлиминирующей терапии, которая приводила к предотвращению прогрессирования поражения печени, нормализации ее функции (в том числе у всех больных с исходно декомпенсированным циррозом печени), положительной динамике других клинических проявлений (в меньшей степени – неврологических), у большинства пациентов – к восстановлению трудоспособности.

В 4 из 81 наблюдений было обнаружено сочетание БВК с другими моногенными заболеваниями – кавернозными мальформациями головного мозга, гипокалиемическим параличом, фруктоземией, а также наследственным гемохроматозом 1 типа (выявлен молекулярно-генетически). Описанные клинические случаи коморбидности по моногенным заболеваниям представляют интерес в плане изучения взаимодействия патогенетических путей при различных нозологиях. Кроме того, они опровергают устоявшееся представление о крайней редкости моногенной патологии и демонстрируют важность глубокого диагностического поиска даже после выявления первого генетического заболевания.

### **Оценка связи эффекта мутаций и тяжести течения БВК**

Одним из недостаточно исследованных вопросов остается корреляция между генотипом и фенотипом при БВК. В настоящей работе предпринята попытка оценить влияние различных мутаций на тяжесть течения БВК. Для этого пациенты группировались различным образом. В первую очередь группировка по генотипу выполнялась по мажорной мутации с.3207C>A(p.His1069Gln) на пациентов, которые были гомозиготны по данной мутации, компаунд-гетерозиготны, и тех, у которых не было выявлено мутации

c.3207C>A. Вторым способом группировки по генотипу основывался на предположительном эффекте мутации на синтез белка. При этом были сформированы группы пациентов, имеющих на обеих копиях гена «тяжелые» мутации (nonsense, frameshift, splicing); пациентов, имеющих на одной копии гена «тяжелые» мутации, а на второй – «мягкие» мутации (missense, indel); и пациентов, имеющих «мягкие» мутации на обеих копиях гена.

В качестве клинических критериев тяжести течения БВК рассматривался возраст манифестации заболевания (до 15 лет, более 15 и менее 31 года, старше 31 года) и выраженность поражения печени (декомпенсированный цирроз печени, компенсированный цирроз печени, отсутствие цирроза печени) на момент манифестации заболевания.

Ограниченность объемов выборок в целом и в каждой группе больных не позволило получить статистически значимых результатов. Тем не менее, анализ процентного распределения в группах позволяет сделать следующие заключения:

- Случаи поздней манифестации (от 31 года и выше) отмечались только у пациентов, гомозиготных либо компаунд-гетерозиготных по мажорной мутации.
- Отсутствие цирроза печени чаще наблюдалось в группе пациентов, гомозиготных и компаунд-гетерозиготных по мутации c.3207C>A(p.His1069Gln).
- У пациентов, имевших nonsense, frameshift или splicing на обеих копиях гена *ATP7B*, уже при манифестации заболевания наблюдалось тяжелое поражение печени (декомпенсированный цирроз печени), а возраст манифестации в большинстве случаев был ранним (до 15 лет).

Таким образом, в настоящем исследовании не было получено статистически значимых результатов, свидетельствующих о связи специфичности генетической конституции больных по вариантам патологических генотипов и тяжести поражения, отдельно оцененной по показателям времени манифестации и степени вовлеченности в патологический процесс печени. Тем не менее можно отметить, что прослеживается общая, оцененная по исследованным параметрам, тенденция, указывающая на более тяжелое течение БВК при мутациях, потенциально приводящих к значительным нарушениям процессинга белка – nonsense, frameshift, splicing

мутации. Полученные результаты согласуются с данными G. Gromadzka (2005), где показано наличие корреляции нонсенс и фреймшифт мутаций с более ранним и тяжелым течением БВК (Gromadzka G., 2005).

### **Выводы**

1. В результате проведенного исследования в выборке больных из различных регионов России идентифицирована 31 патогенная мутация гена *ATP7B*, приводящая к развитию болезни Вильсона-Коновалова, что указывает на выраженную генетическую гетерогенность заболевания. Информативность исследования составила 96%.
2. В спектре выявленных причин болезни Вильсона-Коновалова наиболее частыми оказались мутации с.3207C>A (p.His1069Gln), с.3190G>A (p.Glu1064Lys) и с.3402delC (p.Ala1135fs), которые встречались в 51,85%, 8,64% и 6,17% всех аллелей соответственно. Идентифицированы 3 новые не описанные ранее патогенные мутации: с.1870-8A>G, с.3655A>T (p.Ile1219Phe), с.3036dupC (p.Lys1013fs).
3. Оценена частота гетерозиготного носительства мутаций гена *ATP7B* в контрольной группе. Обнаружено гетерозиготное носительство только мутации с.3207C>A (p.His1069Gln) с частотой равной 1:89. Носительство других мутаций у лиц группы контроля обнаружено не было.
4. Показано, что болезнь Вильсона-Коновалова характеризуется выраженным полиморфизмом клинических проявлений. Отмечается широкий диапазон возраста манифестации: от 5 до 45 лет (в среднем – 18,57±8,2 лет); различные формы дебюта заболевания: преимущественное поражение печени наблюдалось у 60% больных, преимущественно неврологические и психиатрические проявления - у 31%, у 9% пациентов без клинических проявлений БВК была обнаружена в результате семейного скрининга. Среди внепеченочных проявлений наиболее частыми были нарушения менструальной функции (41% женщин).
5. Выявлено, что диагностика заболевания осуществляется на поздних сроках (в среднем через 34 месяца после проявления первых симптомов), нередко на стадии декомпенсированного цирроза печени или фульминантного гепатита (34,5%), что значительно ухудшает прогноз.
6. При исследовании связи генотипов и тяжести болезни Вильсона-Коновалова прослеживается общая, оцененная по результатам различных

подходов и исследованным параметрам, тенденция, указывающая на более тяжелое течение БВК при мутациях, потенциально приводящих к значительным нарушениям процессинга белка – nonsense, frameshift, splicing мутации.

### **Практические рекомендации**

1. В целях ранней диагностики БВК рекомендуется проведение молекулярно-генетического тестирования всем пациентам с поражением печени неуточненной этиологии, особенно при наличии единичных маркеров БВК и невозможности проведения дифференциальной диагностики иными методами. Внедрение в практику NGS-метода в будущем позволит значительно увеличить (до 96%) информативность молекулярно-генетического исследования без существенного увеличения стоимости.

2. Выявление семейных случаев заболевания подтверждает необходимость проведения семейного генетического скрининга при обнаружении БВК у одного из членов семьи.

3. При планировании деторождения пациентами с БВК для определения прогноза потомству рекомендуется молекулярно-генетическое обследование супруга/супруги. При обнаружении гетерозиготного носительства у партнера риск рождения больного ребенка составляет 50%. В таком случае семье можно рекомендовать применение современных методов преимплантационной и пренатальной диагностики для рождения ребенка, не страдающего БВК.

4. Рекомендуется создание клиничко-генетических баз данных пациентов с БВК (региональных и российских), включающих данные генеалогического, клиничко-лабораторного и молекулярно-генетического обследования и позволяющие осуществлять активный мониторинг семей с БВК для оценки качества медико-генетической помощи, особенностей течения заболевания, качества жизни больных и эффективности терапии.

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1) Балашова, М.С. Создание клинико-генетической базы данных пациентов с болезнью Вильсона-Коновалова/ М.С. Балашова и др. // Медицинская генетика. — 2015. — №2 — С. 18.
- 2) **Игнатова Т.М., Соловьева О. В., Арион Е.А., Балашова М.С., Розина Т.П. Болезнь Вильсона-Коновалова у двух сестер: различия в клиническом течении болезни, успешная терапия / Т.М. Игнатова и др. // Клиническая медицина. — 2016 — №1 — С.70-72.**
- 3) **Балашова М. С. Клиническая ценность секвенирования гена АТР7В в диагностике болезни Вильсона-Коновалова / М. С. Балашова и др. // Медицинская генетика. — 2016. — Т. 15, № 7. — С. 14–16.**
- 4) Балашова М.С. Наблюдение сочетания болезни Вильсона-Коновалова (БВК), наследственной непереносимости фруктозы и хронического гепатита С (ХГС) / М. С. Балашова и др. // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии (приложение №49. Материалы XXII ежегодного Российского конгресса "Гепатология сегодня"). — 2017. — Т.27, № 1.—С.26
- 5) Соловьева О.В. Влияние терапии Д-пеницилламином (Д-ПАМ) на уровень Cu, Fe, Zn, Mg в сыворотке и качество жизни (КЖ) пациентов с болезнью Вильсона-Коновалова (БВК) / Соловьева О.В., Балашова М.С., Тулузановская И.Г., Барашков Г.К., Игнатова Т.М. // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии (приложение №49. Материалы XXII ежегодного Российского конгресса "Гепатология сегодня"). — 2017. — Т.27, № 1.—С.26
- 6) Balashova M. S. Mutations spectrum of ATP7B gene and two possible modifier genes in a Russian patient with Wilson Disease / M. S. Balashova et al. // Proceedings from European Human Genetics Conference 2017 (Copenhagen, Denmark).
- 7) Belousova O. B. Hereditary multiple Cerebral Cavernous Malformations associated with Wilson's Disease and Multiple Lypomatosis: case report. Olga B. Belousova, Dmitry N. Okishev', Tatyana M. Ignatova, Maria S. Balashova, Eugenia S. Boulygina // World Neurosurgery. — 2017 — V. 105 — 1034.e1 - 1034.e6
- 8) Balashova M.S. Clinical and genetic databases as a way of using of OMIC's technologies for personalized medicine/ M. S. Balashova et al.// Proceedings from the Annual Scientific Meeting «Clinical proteomics. Postgenome medicine» 2017.

- 9) Балашова М.С. Молекулярно-генетические взаимодействия при болезни Вильсона-Коновалова/ М. С. Балашова и др. // Генетика человека и патология. Сборник научных трудов. — 2017.— Выпуск 11.
- 10) Тулузановская И.Г. Болезнь Вильсона-Коновалова: внутрисемейный клинический полиморфизм / И.Г. Тулузановская, Н.А. Жученко, М.С. Балашова, М.И. Филимонов, Т.П. Розина, О.С. Глотов, А.Ю. Асанов// Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. — 2017.— — Т. 96, № 6 — С. 215-216.**
- 11) Тулузановская И.Г. Болезнь Вильсона-Коновалова: клинический полиморфизм и генетическая гетерогенность (клиническое наблюдение) / И.Г. Тулузановская // Материалы XXIII ежегодного Российского конгресса "Гепатология сегодня". —2018. — Т.28, № 2.—С.47
- 12) Balashova M. S. The frequency of mutations and polymorphisms in the genes involved in the metabolism of copper (ATP7B, COMMD1 and XIAP) / M. S. Balashova et al. // Proceedings from European Human Genetics Conference 2018 (Milan, Italy).

## Список сокращений

АроЕ - алипопротеин Е

АТР7В – аденозинтрифосфаттрансфераза 7 В

COMMD1 - домен 1 протеина метаболизма меди MURR1

MLPA - мультиплексная амплификация лигированных зондов (англ. Multiplex ligation-dependent probe amplification)

NGS – секвенирование нового поколения (англ. Next Generation Sequencing)

XIAP - X-сцепленный ингибитор апоптоза

АЛТ - аланинаминотрансфераза

АСТ – аспартатаминотрансфераза

БВК – болезнь Вильсона-Коновалова

ГГТ – гамма-глутаминтрансфераза

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

Д-ПАМ – Д-пеницилламин

МРТ – магнитная резонансная томография

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ЦНС – центральная нервная система