

Комплексный подход в диагностике болезни Вильсона–Коновалова в Сибирском регионе

Жалсанова И.Ж.¹, Фонова Е.А.¹, Сивцев А.А.¹, Постригань А.Е.¹, Саковская Т.А.², Васильева О.Ю.¹, Зарубин А.А.¹, Минайчева Л.И.¹, Агафонова А.А.¹, Петрова В.В.¹, Равжаева Е.Г.¹, Салюкова О.А.¹, Филимонова М.Н.¹, Назаренко Л.П.¹, Сеитова Г.Н.¹, Скрыбин Н.А.¹

1 — Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук 634050, г.Томск, ул. Набережная реки Ушайки, д. 10

2 — ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

Болезнь Вильсона-Коновалова – редкое аутосомно-рецессивное заболевание, которое характеризуется патологическим накоплением меди в печени, головном мозге и других тканях. Дифференциальная диагностика болезни Вильсона-Коновалова представляет собой сложную задачу вследствие выраженной гетерогенности клинических проявлений. Это подчеркивает важность разработки как новых методов диагностики, так и усовершенствования существующих. В рамках настоящего исследования было проведено сравнение клинической диагностики заболевания с результатами молекулярно-генетических исследований. Проанализировано 42 пациента с подозрением на болезнь Вильсона-Коновалова. Произведена оценка значения биохимических показателей метаболизма меди (концентрация церулоплазмينا, щелочной фосфатазы, общего билирубина, АСТ, АЛТ сыворотки крови, содержание меди в печени, экскреция меди с мочой) согласно Лейпцигской количественной шкале. Для молекулярно-генетического анализа использовали геномную ДНК. Обогащение интересующих регионов генома проводилось с помощью ПЦР длинных фрагментов. Для подготовки ДНК библиотек был использован набор Nextera DNA Flex (Illumina, США). Секвенирование проводилось на приборе Illumina MiSeq (Illumina, США). В результате исследования в 62,5% случаев у пациентов, направленных на подтверждение диагноза (по Лейпцигской количественной шкале), были найдены мутации в гене *ATP7B*, что подтверждает ценность комплексной диагностики по Лейпцигской количественной шкале с учетом клинической симптоматики и лабораторных показателей метаболизма меди.

Ключевые слова: болезнь Вильсона-Коновалова, ген *ATP7B*, Лейпцигская количественная шкала.

Для цитирования: Жалсанова И.Ж., Фонова Е.А., Сивцев А.А., Постригань А.Е., Саковская Т.А., Васильева О.Ю., Зарубин А.А., Минайчева Л.И., Агафонова А.А., Петрова В.В., Равжаева Е.Г., Салюкова О.А., Филимонова М.Н., Назаренко Л.П., Сеитова Г.Н., Скрыбин Н.А. Комплексный подход в диагностике болезни Вильсона–Коновалова в Сибирском регионе. *Медицинская генетика* 2021; 20(10): 53-56.

DOI: 10.25557/2073-7998.2021.10.53-56

Автор для корреспонденции: Жалсанова И.Ж., e-mail: irina.zhalsanova@medgenetics.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России (тема АААА-А20-120041390002-0).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Поступила: 25.09.2021.

Genetic and clinical characteristic of Wilson–Konvalov disease in the Siberian region

Zhalsanova I.Zh.¹, Fonova E.A.¹, Sivcev A.A.¹, Postriгань A.E.¹, Sakovskaya T.A.², Vasilyeva O.Yu.¹, Zarubin A.A.¹, Minaycheva L.I.¹, Agafonova A.A.¹, Petrova V.V.¹, Ravzhaeva E.G.¹, Salyukova O.A.¹, Filimonova M.N.¹, Nazarenko L.P.¹, Seitova G.N.¹, Skryabin N.A.¹

1 — Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences 10 Naberejnaya Ushaiki, Tomsk, 634050, Russian Federation

2 — Siberian State Medical University 2 Moskovsky trakt 2, Tomsk, 634055, Russian Federation

Wilson's disease is a rare autosomal recessive disorder characterized by abnormal accumulation of copper in the liver, brain, and other tissues. Wilson's disease differential diagnosis is a difficult task due to the pronounced clinical heterogeneity. This emphasizes the importance of developing both new diagnostic methods and improving existing ones. As part of this study, we compared clinical diagnostics with the results of molecular genetic studies. We analyzed 42 patients with suspected Wilson's disease. The biochemical parameters copper metabolism values were assessed (serum ceruloplasmin concentration, liver copper content, urinary copper excretion, alkaline phosphatase, total bilirubin, AST, ALT) according to the Leipzig quantitative scale. We used genomic DNA for molecular genetic analysis. Regions of interest in the genome was enriched using long-range PCR. The Nextera DNA Flex kit (Illumina, USA) was used to prepare DNA libraries. Sequencing was performed on an Illumina MiSeq device (Illumina, USA). As a result of the study, in 62.5% of cases in patients aimed at confirming the diagnosis (according to the Leipzig quantitative scale), we found mutations in the *ATP7B* gene, which confirms the value of a compre-

hensive diagnosis according to the Leipzig quantitative scale, taking into account the clinical symptoms and copper metabolism laboratory parameters.

Keywords: Wilson disease, *ATP7B* gene, Leipzig scoring system.

For citation: Zhalsanova I.Zh., Fonova E.A., Sivcev A.A., Postrigan A.E., Sakovskaya T.A., Vasilyeva O.Yu., Zarubin A.A., Minaycheva L.I., Agafonova A.A., Petrova V.V., Ravzhaeva E.G., Salyukova O.A., Filimonova M.N., Nazarenko L.P., Seitova G.N., Skryabin N.A. Genetic and clinical characteristic of Wilson-Konovalov disease in the Siberian region. *Medicinskaya genetika [Medical genetics]* 2021; 20(10): 53-56. (In Russ.)

DOI: 10.25557/2073-7998.2021.10.53-56

Corresponding author: I.Zh. Zhalsanova, e-mail: irina.zhalsanova@medgenetics.ru

Funding. The research was supported by Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation

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

Accepted: 25.09.2021.

Введение

Проблема ранней диагностики орфанных болезней является актуальной ввиду чрезвычайной гетерогенности этих болезней как в отношении систем и органов, которые они поражают, так и в степени клинического полиморфизма. Пациент успевает пройти ряд врачей-специалистов для исключения более частых причин своего состояния, прежде чем он попадет к врачу-генетику. В связи с этим особо важным аспектом диагностики является правильный алгоритм действий врача при подозрении на наследственное заболевание.

Болезнь Вильсона-Коновалова (БВК), или гепатолентикулярная дегенерация, одно из немногих генетических заболеваний обмена веществ, которое поддается патогенетическому лечению при условии правильной и ранней диагностики. БВК является аутосомно-рецессивным наследственным заболеванием, возникающим в результате нарушения метаболизма меди, что приводит к ее накоплению в организме и появлению печеночной, неврологической и психиатрической дисфункции. Этиология БВК связана с мутацией гена транспортирующей медь АТФазы Р-типа (*ATP7B*), кодирующего белок *ATP7B* — основной регулятор метаболизма меди в печени. Распространенность БВК в России по данным регистра редких болезней составляет около 1:166600 [1]. Для БВК, как для большинства других нарушений обмена веществ, характерен выраженный клинический полиморфизм. У пациентов с БВК могут встречаться как печеночные, так и неврологические патологические признаки, тем самым затрудняя диагностику заболевания. В настоящий момент для диагностики БВК используется балльная Лейпцигская шкала (8th International Meeting on Wilson's disease, Leipzig, 2001), которая дает четкие критерии для диагностики: диагноз установлен (≥ 4 баллов), сомнителен (3 балла) и маловероятен (≤ 2 баллов) [2, 3]. Шкала учитывает различные клинические проявления, которые складываются в характерный фенотип пациента

с БВК, и включает такие показатели, как кольца Кайзера-Флейшера, неврологические симптомы, концентрация церулоплазмينا сыворотки, содержание меди в печени, экскреция меди с мочой, а также результаты молекулярно-генетической диагностики, которая является основным и часто заключительным критерием постановки диагноза.

Среди биохимических показателей наиболее значимыми диагностическими критериями являются снижение концентрации гемоглобина крови, индекс уровня щелочной фосфатазы (в МЕ/л)/общий билирубин (в мг/дл) < 4 , индекс АСТ/АЛТ $> 2,2$. В сумме эти индексы имеют высокую диагностическую чувствительность и специфичность при БВК [3]. Поиск мутации во многом необходим для лечения пациента и для профилактики заболевания у потомства. Таким образом, ключом к постановке диагноза является сочетание клинических, биохимических и молекулярно-генетических данных.

Целью настоящей работы стала комплексная диагностика по клиническим и биохимическим показателям, характеризующим обмен меди, и их сравнение с результатами молекулярно-генетического анализа.

Методы

Исследование было выполнено с использованием оборудования центра коллективного пользования «Медицинская геномика» на базе НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. Все семьи, принявшие участие в исследовании, подписали информированное согласие. Проведение работы было одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. В исследовании приняли участие 42 пациента, направленные врачами-генетиками на диагностику носительства мутаций в гене *ATP7B*. У всех пациентов были проанализированы клинические и лабораторные показатели, а также проведен анализ родословной и собраны данные для оценки по Лейпцигской количественной шкале.

В работе использовали геномную ДНК обследуемых, выделенную из цельной венозной крови методом фенол-хлороформной экстракции. Обогащение интересующих регионов генома проводилось с помощью ПЦР длинных фрагментов с использованием набора БиоМастер LR HS-ПЦР-Color (2x) (Biolabmix, Россия) с наработкой фрагментов на амплификаторе С 1000TM Thermal Cycler BIO-RAD. Приготовление ДНК-библиотек производилось с использованием набора Nextera Flex (Illumina, США) по протоколу, рекомендованному производителем. Массовое параллельное секвенирование осуществлялось на секвенаторе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора MiSeq Reagent Kit V2 (Illumina, США) по рекомендованному производителем протоколу. Полученные данные массового параллельного секвенирования прошли биоинформационную обработку. Проведена статистическая обработка данных с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Результаты представлены в виде медианы и межквартильного расстояния Me (Q1- Q3). Различия считались достоверными на уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

На молекулярно-генетическую диагностику болезни Вильсона-Коновалова было направлено 42 пациента, из них 35 пробандов и 7 родственников (родители, сибсы). Согласно клиническим рекомендациям 2001 г. к каждому пациенту была применена Лейпцигская количественная шкала для диагностики БВК. Таким образом, на подтверждение диагноза БВК было направлено 8 пробандов (≥ 3 баллов), на исключение БВК было направлено 27 пробандов и 7 их родственников (≤ 2 баллов).

Исследование на наличие мутаций гена *ATP7B* проведено методом массового параллельного секвенирования. В группе пациентов, отправленных на подтверждение диагноза, мутации были выявлены у 5 (62,5%). Из 27 пациентов, направленных на исключение БВК, у 22 патогенных вариантов не обнаружено, гетерозиготное носительство было выявлено у 5 пациентов. Всего, включая родственников пациентов, у 14 человек были найдены мутации в искомом гене, 10 у пробандов и 4 у родственников (8 мутаций): с.3207C>A:p.His1069Gln, с.3556+1G>T, с.3036dupC:p.Lys1013fs, с.254G>T:p.Gly85Val, с.3128T>C:p.Leu1043Pro, с.*1265A>G:3'UTR, с.2605G>T:p.Gly869Ter, с.3973delC:p.Leu1325TrpfsTer3.

Поставленный предварительный диагноз БВК у пациентов с клинической и биохимической симптоматикой позволил начать лечение еще до получения молекулярно-генетического подтверждения. У пациентов с единственной выявленной мутацией диагноз БВК был поставлен на основании сочетания клинической, биохимической симптоматики и выявленной мутации согласно Лейпцигской шкале: выявленное носительство дает дополнительный балл, который позволил перевести пациентов с подозрением на БВК в категорию «подтвержденный диагноз».

На втором этапе исследования нами было проведено сравнение значений биохимических показателей (церулоплазмин, уровень свободной меди сыворотки, щелочная фосфатаза, общий билирубин, АСТ, АЛТ, суточная экскреция меди с мочой) у пациентов с неподтвержденной мутацией в гене *ATP7B* и пациентов с обнаруженной мутацией для оценки клинической картины и определения показателей, изменение зна-

Значения биохимических показателей пациентов без мутации в гене *ATP7B* и пациентов с подтвержденной мутацией в гене *ATP7B*

Показатель	Референтные значения	Пациенты без мутации в гене <i>ATP7B</i> (28 пациентов)	Пациенты с подтвержденной мутацией в гене <i>ATP7B</i> (14 пациентов)
		Me (Q1- Q3)*	Me (Q1 - Q3)
Церулоплазмин, мкмоль/л	0,2-0,6	0,19 (0,13-0,23)	0,10 (0,4-0,18)
Свободная медь сыворотки, мкмоль/л	13-19	10,94 (9,6-15,45)	7,95 (6,49-12,59)
Суточная экскреция меди с мочой, мкмоль/л/сут	До 1,6	1,13 (0,4-1,5)	5,57 (0,31-7,15)
Щелочная фосфатаза, ЕД/л	40-130	88 (58,0-160,0)	240,5 (144,7-369,4)
Общий билирубин, мкмоль/л	8,5-20,5	9,2 (7,0-14,0)	11,4 (8,2-21,5)
АСТ, ЕД/л	До 30	26 (18,0-37,0)	113,5 (35,0-173,5)
АЛТ, ЕД/л	До 40	130 (120-143)	157 (51,5-247,0)

Примечание: * — Me — медиана, Q1 — первый квартиль (25%), Q3 — третий квартиль (75%).

чений которых дает достоверное представление о развитии заболевания (таблица).

В результате статистической обработки данных, значимые различия были выявлены при сравнении уровня церулоплазмينا ($p=0,007$), суточной экскреции меди с мочой ($p=0,05$), щелочной фосфатазы ($p=0,0001$), АЛТ ($p=0,002$) и АСТ ($p=0,0003$) в группах пациентов с диагнозом БВК и без него. Эти результаты свидетельствуют о диагностической значимости данных критериев для постановки диагноза «болезнь Вильсона-Коновалова». Предполагалось обнаружение различий в уровне свободной меди сыворотки, но это предположение не подтвердилось. Это может быть объяснено тем, что пациенты с БВК наблюдаются в Генетической клинике, регулярно получают консультации врача-генетика, всем пациентам назначено лечение и диета с пониженным содержанием меди.

Заключение

С развитием технологий многие диагностические методики становятся доступнее для населения, что отражается на количестве пациентов, направленных на молекулярно-генетическую диагностику, из-за чего можно наблюдать снижение выявляемости мутаций. В настоящем исследовании была показана важность следования клиническим рекомендациям при направлении на молекулярно-генетическую диагностику при БВК. Так после правильной оценки клинических параметров пациента по Лейпцигской шкале в 62,5% случаев у пациентов были найдены мутации в гене *ATP7B*.

Литература

1. Соколов А.А., Дембровский В.Н., Красильникова Е.Ю. Оказание медицинской помощи и лекарственное обеспечение пациентов, страдающих жизнеугрожающими и хроническими прогрессирующими редкими заболеваниями. Болезнь Вильсона (гепатолентикулярная дегенерация). *Проблемы стандартизации здравоохранения* 2015; 5(6): 30-36.
2. Ferenci P., Caca K., Loudianos G., et al., Diagnosis and phenotypic classification of Wilson disease. *Liver Int.* 2003; 23(3): 139-42. DOI: 10.1034/j.1600-0676.2003.00824.x
3. Асанов А.Ю., Соколов А.А., Волгина С.А., Горячева Л.Г., Густов А.Г., Иванова-Смоленская И.А., Копишинская С.В., Новиков П.В., Полешук В.В., Поляков А.В., Розина Т.П., Хавкин А.И. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению болезни Вильсона-Коновалова (гепатолентикулярная дегенерация). С-Пб.: Литография СПб., 2015. 60 с.

References

1. Sokolov A.A., Dembrovskiy V.N., Krasilnikova E.Y. Okazaniye meditsinskoj pomoshchi i lekarstvennoye obespecheniye patsiyentov, stradayushchikh zhizneugrozhayushchimi i khronicheskimi progressiruyushchimi redkimi zabolevaniyami. Bolezn' Vil'sona (gepatolentikul'yarnaya degeneratsiya) [Provision of medical care and pharmaceutical supplies for patients with life-threatening and chronic rare diseases progresses. Wilson's disease (hepatolenticular degeneration)]. *Problemy standartizatsii zdravookhraneniya [Health care Standardization Problems]* 2015; 5(6): 30-36. (In Russ.).
2. Ferenci P., Caca K., Loudianos G., et al., Diagnosis and phenotypic classification of Wilson disease. *Liver Int.* 2003; 23(3): 139-42. DOI: 10.1034/j.1600-0676.2003.00824.x
3. Asanov A.Yu., Sokolov A.A., Volgina S.A., Goryacheva L.G., Gustov A.G., Ivanova-Smolenskaya I.A., Kopishinskaya S.V., Novikov P.V., Poleshchuk V.V., Polyakov A.V., Rozinova T.P., Khavkin A.I. Federal'nyye klinicheskiye rekomendatsii po diagnostike i lecheniyu bolezni Vil'sona-Konovalova (gepatolentikul'yarnaya degeneratsiya) [Federal clinical guidelines for the diagnosis and treatment of Wilson-Konovalov disease (hepatolenticular degeneration)]. St. Petersburg: Lithograph SPb., 2015. 60 p. (In Russ.).