

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Сивцев А.А., Жалсанова И.Ж., Постригань А.Е., Фонова Е.А. Васильева О.Ю., Зарубин А.А., Минайчева Л.И., Агафонова А.А., Петрова В.В., Равжаева Е.Г., Салюкова О.А., Скрябин Н.А.

АНАЛИЗ СПЕКТРА МУТАЦИЙ В ГЕНЕ *ATP7B* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАССОВОГО ПАРАЛЛЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ У ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ВИЛЬСОНА-КОНОВАЛОВА

Научно-исследовательский институт медицинской генетики ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН», 634050, г. Томск, Россия

*Целью работы являлся поиск мутаций в гене *ATP7B* с помощью массового параллельного секвенирования у пациентов с болезнью Вильсона-Коновалова в Томской области. Молекулярно-генетический анализ проводили у 42 пациентов в возрасте от 1 года до 33 лет с подозрением на болезнь Вильсона-Коновалова. Обогащение интересующих регионов генома проводили 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 проведенной работы выявлено 9 патогенных вариантов. Все выявленные варианты были ранее описаны в литературе и встречались у пациентов с болезнью Вильсона-Коновалова. Были выявлены 5 миссенс-мутаций, 1 мутация сайта сплайсинга и 3 мутации со сдвигом рамки считывания. Чаще всего у пациентов с болезнью Вильсона-Коновалова в Томской области встречался вариант с.3207C>A, данный вариант является наиболее распространенным как в Российской Федерации, так и в других европейских популяциях. Кроме того, был обнаружен патогенетически значимый вариант с.3036dupC, который, вероятно является эндемичным для России. Выявленный спектр и частота мутаций в целом совпадают с мутациями, выявленными в европейских популяциях. При этом в результате проведенной работы идентифицирован вариант нуклеотидной последовательности в гене *ATP7B*, эндемичный для России.*

Ключевые слова: болезнь Вильсона-Коновалова; массовое параллельное секвенирование; ген *ATP7B*.

Для цитирования: Сивцев А.А., Жалсанова И.Ж., Постригань А.Е., Фонова Е.А. Васильева О.Ю., Зарубин А.А., Минайчева Л.И., Агафонова А.А., Петрова В.В., Равжаева Е.Г., Салюкова О.А., Скрябин Н.А. Анализ спектра мутаций в гене *ATP7B* с использованием массового параллельного секвенирования у пациентов с болезнью Вильсона-Коновалова. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (4): 250-256. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-4-244-249>

Для корреспонденции: Сивцев Алексей Алексеевич, мл. науч. сотр. лаб. геномики орфанных болезней; e-mail: sivtsev.alexey@medgenetics.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ в рамках государственного задания № АААА-А19-119090990020-0 и поддержано грантом Федерального Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере в рамках программы «УМНИК» на проведение НИР по договору №55954.

Поступила 05.09.2021

Принята к печати 21.11.2021

Опубликовано 17.04.2022

Sivtsev A.A., Zhalsanova I.Zh., Postriгань A.E., Fonova E.A., Vasilyeva O.Yu., Zarubin A.A., Minaicheva L.I., Agafonova A.A., Petrova V.V., Ravzhaeva E.G., Salyukova O.A., Skryabin N.A.

ANALYSIS OF MUTATIONS SPECTRUM IN THE *ATP7B* GENE IN PATIENTS WITH WILSON DISEASE USING MASSIVELY PARALLEL SEQUENCING

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Science, 634050, Tomsk, Russian Federation

*The study aimed to search for mutations in the *ATP7B* gene using massively parallel sequencing in patients with Wilson disease in the Tomsk region. For 42 patients with suspected Wilson's disease (aged from 1 to 33 years) was performed molecular genetic analysis. Enrichment of the interest genome regions was carried out by the long-range PCR. DNA libraries with ligated adapters were constructed with Nextera DNA Flex (Illumina, USA) kit. Sequencing was performed on the Illumina MiSeq platform (Illumina, USA). As a result of this work, we identified 9 pathogenic genetic variants. All variants were previously described in the literature and were found in patients with Wilson's disease. Five missense mutations, one splice site mutation, and 3 frame-shift mutations were identified. In patients with Wilson's disease in the Tomsk region, the most common variant was c.3207C>A, this variant is the most common both in the Russian Federation and in other European populations. Also, a pathogenic variant c.3036dupC was found, which is probably endemic to the Russian Federation.*

Key words: Wilson disease; massively parallel sequencing (MPS); *ATP7B*.

For citation: Sivtsev A.A., Zhalsanova I.Zh., Postrigan A.E., Fonova E.A., Vasilyeva O.Yu., Zarubin A.A., Minaicheva L.I., Agafonova A.A., Petrova V.V., Ravzhaeva E.G., Salyukova O.A., Skryabin N.A. Analysis of mutations spectrum in the *ATP7B* gene in patients with Wilson disease using massively parallel sequencing. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (4): 244-249. DOI: https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-4-244-249

For correspondence: Sivtsev A.A., Junior Researcher, Laboratory of Genomics of Orphan Diseases; e-mail: sivtsev.alexey@medgenetics.ru

Information about authors:

Sivtsev A.A., <https://orcid.org/0000-0002-1670-2942>;
Zhalsanova I.Zh., <https://orcid.org/0000-0001-6848-7749>;
Postrigan A.E., <https://orcid.org/0000-0002-5144-001X>;
Fonova E.A., <https://orcid.org/0000-0002-1338-5451>;
Vasilyeva O.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-5797-0014>;
Zarubin A.A., <https://orcid.org/0000-0001-6568-6339>;
Minaicheva L.I., <https://orcid.org/0000-0002-1752-2521>;
Agafonova A.A., <https://orcid.org/0000-0003-0169-2072>;
Petrova V.V., <https://orcid.org/0000-0003-4400-994X>;
Ravzhaeva E.G., <https://orcid.org/0000-0002-9516-7262>;
Salyukova O.A., <https://orcid.org/0000-0002-8922-3635>;
Skryabin N.A., <https://orcid.org/0000-0002-2491-3141>.

Conflict of interest. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. This work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation within the framework of state task No. ААААА 19-119090990020-0 and supported by a grant from the Federal Fund for Assistance to the Development of Small Forms of Enterprises in the Scientific and Technical Sphere within the framework of the UMNIC program for conducting research under contract No. 55954.

Received 05.09.2021
Accepted 21.11.2021
Published 17.04.2022

Введение. Болезнь Вильсона–Коновалова (БВК, гепатолентикулярная дегенерация, гепатоцеребральная дистрофия, OMIM 277900) – тяжелое прогрессирующее наследственное заболевание, передающееся по аутосомно-рецессивному типу наследования, в основе которого лежит нарушение экскреции меди из организма, приводящее к избыточному накоплению этого микроэлемента в тканях и сочетанному поражению паренхиматозных органов (прежде всего печени) и головного мозга (преимущественно подкорковых ядер) [1]. Распространенность БВК по данным Orphanet составляет 1-9 случаев на 100 000 населения. Частота выявления новых случаев – от 1 на 30 000 до 1 на 100 000 населения. Органами мишенями чаще всего выступают печень и подкорковые ядра. Можно выделить две стадии течения заболевания: латентную и клинических проявлений. Латентная стадия выявляется только изменением лабораторных показателей при отсутствии клинических проявлений. Так же выявляют стадию отрицательного баланса меди, при которой наблюдается регресс клинических и лабораторных проявлений болезни Вильсона–Коновалова [1].

Причиной возникновения БВК являются мутации гена *ATP7B*, который локализован на 13 хромосоме в локусе 13q14.3 и кодирует медьтранспортирующую АТФ-азу Р-типа – АТР7В. К настоящему времени идентифицировано более 900 различных мутаций в данном гене, и для 380 из них доказана роль в патогенезе заболевания. Чаще всего встречаются миссенс-мутации, также имеют место делеции, инсерции, нонсенс-мутации, мутации со сдвигом рамки считывания и мутации сайтов сплайсинга. Наиболее частой мутацией, приводящей к возникновению БВК в европейских популяциях, является точечная мутация с.3207С>А в экзоне 14, приводящая к замене аминокислоты гистидина в положении 1069 на глутаминовую кислоту (His1069Gln). Доля мутации с.3207С>А в российской выборке больных составля-

ет около 50% [2]. Клинические симптомы заболевания наиболее выражены у пациентов-гомозигот, имеющих две идентичные мутации. Однако наибольшее число пациентов являются компаунд-гетерозиготами, т.е. имеют различные мутации в гомологичных хромосомах, каждая из которых унаследована от одного из родителей.

Материал и методы. Молекулярно-генетический анализ проводился 42 пациентам в возрасте от 1 года до 33 лет с подозрением на болезнь Вильсона–Коновалова. 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 биоэтике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

Все пациенты были распределены на две группы согласно балльной количественной шкале [1]. Пациенты были оценены по типичным клиническим симптомам и признакам БВК (кольца Kaysera-Fleischer, неврологические симптомы или характерные проявления при МРТ головного мозга, концентрация церулоплазмينا сыворотки крови и экскреция меди с мочой). Критерием для направления пациентов на подтверждение БВК являлся пороговый балл от 3 единиц и выше (без учета баллов за молекулярно-генетическую диагностику). При показателе от 2 баллов и ниже принято считать, что диагноз БВК маловероятен, но не исключен. Не для всех пациентов были доступны данные о некоторых критериях Лейпцигской шкалы (гемолитическая анемия с отрицательной пробой Кумбса, содержание меди в печени), поэтому было необходимо исследование большего количества показателей, для чего группа пациентов с баллами от 2-х и меньше была направлена на исключение БВК [1].

Всего на молекулярно-генетическую диагностику болезни Вильсона–Коновалова было отправлено 42 па-

циента, из них 35 пробандов и 7 родственников (родители, сибсы). Из них на подтверждение БВК было направлено 8 пробандов (по Лейпцигской шкале от трех и более баллов), на исключение БВК было направлено 27 пробандов и 7 их родственников (по Лейпцигской шкале до двух баллов включительно).

В работе использовали геномную ДНК обследуемых, выделенную из цельной венозной крови методом фенол-хлороформной экстракции. Для анализа мутаций в гене *ATP7B* была разработана панель праймеров для секвенирования полной последовательности гена с помощью таргетного массового параллельного секвенирования (табл. 1). Обогащение интересующих регионов генома проводилось с помощью ПЦР длинных фрагментов с использованием набора БиоМастер LR HS-ПЦР-Color (2x) (BioLabiMix, Россия) с наработкой фрагментов на амплификаторе SureCyler 8800 (Agilent Technologies, США). Амплификация проводилась при следующем режиме: 94 °C, 4 мин; 10 циклов: 94 °C, 20 с; 57 °C, 30 с; 68 °C, 13 мин; 20 циклов: 94 °C, 20 с; 57 °C, 30 с; 68 °C, 13 мин (+10 с за цикл). Присутствие амплифицированных продуктов проверялось с помощью электрофореза в 1% агарозном геле.

Для пробоподготовки использовалось лигирование адаптеров с помощью тагментазы (Nextera DNA flex, Illumina, США). Для определения концентрации образцов вкДНК использовался флуориметр Qubit 3.0 (Invitrogen, США) с набором реактивов Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.). Проверку качества ДНК библиотек проводили с помощью электрофоретического биоанализатора «Agilent 2100 Bioanalyzer» (Agilent Technologies, США). Анализ ДНК пациентов проведен на секвенаторе нового поколения

MiSeq (Illumina, США). Обработка данных секвенирования проведена с использованием стандартного пакета программ. Оценка качества прочтений осуществлялась с помощью программы FastQC. Для удаления адаптеров и тримминга последовательности использовался программный пакет Trimmomatic-0.36. Выравнивание прочтений на целевые последовательности гена *ATP7B* (GRCh37/hg19) осуществлялось с помощью Bowtie2. Для аннотирования выявленных генетических вариантов использовалась программа Annotvar.

Оценка клинической релевантности выявленных вариантов производилась в соответствии с протоколом, рекомендованным Российским обществом медицинских генетиков, при этом использовались базы данных OMIM, ExAC, gnomAD, «1000 Genomes», LOVD 3.0 и литературные данные [5].

Все выявленные мутации были подтверждены с помощью прямого секвенирования по Сэнгеру. Реакцию секвенирования проводили в соответствии с протоколом производителя с использованием набора BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Секвенирование осуществлялось на капиллярном секвенаторе ABI Prism 3730 (Applied Biosystems, США). Результаты анализировали с помощью программы BioEdit 7.2.

Результаты и обсуждение. Проведено исследование на наличие мутаций гена *ATP7B* у 42 пациентов. Было выявлено 3 семейных и 7 спорадических случаев. У 6 пациентов выявлены причины болезни Вильсона-Коновалова – 5 компаунд-гетерозигот и одна гомозиготная мутация *ATP7B* с.3207C>A, у 9 пациентов найдена одна мутация в гене *ATP7B*, ассоциированная с болезнью Вильсона-Коновалова. Частая мутация *ATP7B*

Таблица 1

Праймеры для амплификации фрагментов гена *ATP7B*

Последовательность праймеров	Длина ПЦР-продукта (п.о.)	Координаты (hg38)
F1 5'-GAAAGTGGAGCGAGTGTGGA-3'	7560	chr13:51,973,844-51,981,403
R1 5'-AGCAGGGCTCACCTATACCA-3'		
F2.4 5'-AATTCTCACGGATTTCCAAAGCAG-3'	5509	chr13:51,964,406-51,969,914
R2.4 5'-TCTCTTTCTTACCCAGTGATGTG-3'		
F2.5 5'-TCAAACATAGCATGTTCTAGGCATC-3'	6721	chr13:51,967,821-51,974,541
R2.5 5'-TTACAAAGCACTAACCCAAAGAGAC-3'		
F4 5'-TTTTTCGGGAAAGCAGTGCG-3'	8282	chr13:51,939,724-51,948,005
R4 5'-CATACGAGAGGGCAGACTC-3'		
F5 5'-GTCATACGTGCTCCTTGCA-3'	6561	chr13:51,932,933-51,939,493
R5 5'-CAATTAAGTACGCGACAGCGG-3'		
F7 5'-TGCTCACCTCAACAACCTTGC-3'	5602	chr13:52,006,868-52,012,469
R7 5'-CCACCTCCCACTGAAGGAAT-3'		
F13 5'-CTAGTGGAGATGCTTGCTG-3'	5341	chr13:51,931,715-51,937,055
R13 5'-CAATGGGACATGCACACAAC-3'		
F15 5'-AGAGTCCAAACTCACGAGGA-3'	8348	chr13:51,956,648-51,964,995
R15 5'-CAGTAGTCCAAAGCGAGACC-3'		
F16 5'-TGGTACTTCTACGTTTCAGGC-3'	5190	chr13:51,953,343-51,958,532
R16 5'-ACTAAAGGTCAGACCCTCT-3'		
F17 5'-TGGTGGATAGCAAGTAACGC-3'	11454	chr13:51,946,315-51,957,768
R17 5'-TTGATGAGGATGCCGTTCTG-3'		

Таблица 2

Варианты нуклеотидной последовательности в гене *ATP7B*, выявленные в данном исследовании

Мутация*	Число хромосом	Частота, %
c.3207C>A:p.His1069Gln	10	50,0
c.3556+1G>T	1	5,0
c.3036dupC:p.Lys1013fs	3	15,0
c.254G>T:p.Gly85Val	1	5,0
c.3128T>C:p.Leu1043Pro	1	5,0
c.*1265A>G: 3'UTR	1	5,0
c.2605G>T:p.Gly869Ter	2	10,0
c.3973delC:p.Leu1325TrpfsTer3	1	5,0

Примечание. * – позиция кДНК указана в варианте транскрипта NM_000053.

c.3207C>A составила 10 из 20 найденных вариантов, что соответствует популяционной частоте в Российской Федерации (табл. 2) [4].

Из группы пациентов, отправленных на подтверждение БВК, гомозиготный и компаунд-гетерозиготные варианты были выявлены у 5 индивидуумов (62,5%), у одного выявлено гетерозиготное носительство, у 2-х пациентов патогенных вариантов не обнаружено. Из 27 пациентов, направленных на исключение БВК, у 22 патогенных вариантов не обнаружено, гетерозиготное носительство было выявлено у 5 пациентов. При уточнении клиничко-генеалогического анамнеза было выяснено, что

у троих из них есть родственники первой степени родства с подтвержденной болезнью Вильсона-Коновалова.

В результате проведенной работы обнаружено: три миссенс-мутации, две мутации со сдвигом рамки считывания; одна мутация в каноническом сайте сплайсинга; одна нонсенс мутация и одна мутация с неизвестной значимостью в 3'-нетранслируемой области гена *ATP7B* (табл. 2).

В семье № 1 у пробанда (пациент 1.1, возраст на момент осмотра 9 лет) и сибса (пациент 1.2, возраст на момент осмотра 14 лет) выставлен диагноз болезнь Вильсона-Коновалова (табл. 3). У пациента 1.1 во время

Таблица 3

Мутации в гене *ATP7B*, идентифицированные у больных с болезнью Вильсона-Коновалова

№ семьи	№ пациента	Возраст, годы	Экзон / интрон	Транскрипт	Мутация
1	1.1	9	Экзон 14	NM_000053	c.3207C>A:p.His1069Gln
	1.2	14	Экзон 14	NM_000053	c.3207C>A:p.His1069Gln
	2.1	8	Экзон 14	NM_000053	c.3207C>A:p.His1069Gln
2			Экзон 13	NM_000053	c.3036dupC:p.Lys1013fs
	2.2	31	Экзон 13	NM_000053	c.3036dupC:p.Lys1013fs
	2.3	33	Экзон 14	NM_000053	c.3207C>A:p.His1069Gln
	2.4	1	-	-	-
3	3.1	21	Экзон 14	NM_000053	c.3207C>A: p.His1069Gln
			Экзон 11	NM_000053	c.2605G>T:p.Gly869Ter
	3.2	10	Экзон 14	NM_000053	c.3207C>A: p. p.His1069Gln
4			Экзон 11	NM_000053	c.2605G>T:p.Gly869Ter
	4.1	24	Интрон16	NM_000053	c.3556+1G>T
5	5.1	15	Экзон 14	NM_000053	c.3207C>A:p.His1069Gln
6	6.1	29	Экзон 14	NM_000053	c.3207C>A:p.His1069Gln
7	7.1	4	Экзон 19	NM_000053	c.3973delC: p.Leu1325TrpfsTer3
8	8.1	25	Экзон 14	NM_000053	c.3207C>A:p.His1069Gln
9	9.1	11	Экзон 21	NM_000053	c.*1265A>G
10			Экзон 13	NM_000053	c.3036dupC:p.Lys1013fs
	10.1	28	Экзон 2	NM_000053	c.254G>T:p.Gly85Val
			Экзон 14	NM_000053	c.3128T>C:p.Leu1043Pro

планового обследования перед хирургическим лечением был выявлен синдром гепатоцитолита (повышение АЛТ, АСТ). Консультирован гепатологом, при исследовании крови на содержание церулоплазмينا и меди. В результате секвенирования обнаружена частая мутация с.3207С>А в гетерозиготном состоянии. Данный вариант нуклеотидной последовательности приводит к замене гистидина на глутамин в позиции 1069 белка (р.His1069Gln). В основе фенотипического проявления лежит изменение третичной структуры белка, и как следствие изменение пространственного расположения АТФ-связывающего сайта. В результате нарушается процесс фосфорилирования Р-домена и уменьшается способность связывать АТФ [7].

Пациент 1.2. Клинических и биохимических проявлений болезни Вильсона-Коновалова нет. По результату секвенирования по Сэнгеру подтверждена мутация с.3207С>А:р.His1069Gln в гетерозиготном состоянии.

В семье № 2 у пробанда (пациент 2.1, возраст на момент осмотра – 8 лет) подтверждён диагноз болезни Вильсона-Коновалова. Обратились на прием к врачу-аллергологу с жалобами на сыпь на коже. Был проведен биохимический анализ крови. Отмечалось повышение АЛТ, АСТ и Гамма-ГТ. Проведен молекулярно-генетический анализ крови на частую мутацию с.3207С>А, в результате которой мутация выявлена в гетерозиготном состоянии. Был выставлен диагноз: болезнь Вильсона-Коновалова. В результате секвенирования полной последовательности гена *ATP7B* выявлена вторая мутация – ранее описанный патогенный вариант с.3036dupC, приводящий к сдвигу рамки считывания (р.Lys1013fs). Предполагается, что в новой рамке считывания образуется стоп-кодон в области аминокислотного остатка 1319. Таким образом, это приводит к потере нормальной функции белка либо посредством его укорочения (синтезируется только 1319 из 1465 аминокислотных остатков) или разрушение мРНК из-за нонсенс-опосредованного распада. Эта мутация была описана в работе М.С. Балашовой [8] при исследовании российской популяции. В своей работе авторы предполагают, что указанная мутация входит в число эндемичных для России вариантов, так как была неоднократно описана при исследовании у пациентов с диагнозом БВК как вероятно патогенная. Данный вариант нуклеотидной последовательности не зарегистрирован в базах данных gnomAD, ExAC и 1000 геномов. При дальнейшем разборе семейного случая установлено наличие у отца пробанда (пациент 2.2) мутации с.3036dupC, а у матери (пациент 2.3) выявлена частая мутация с.3207С>А, у сибса (пациент 2.4) установлено отсутствие данных мутаций

Семья № 3. У пациента 3.1 (возраст на момент осмотра – 21 год). Перед оперативным лечением было зафиксировано повышение уровня трансаминаз. Пациент консультировался гепатологом, было проведено инструментальное исследование печени, поставлен диагноз: цирроз печени. В 2017 г. пациент обратился в клинику иммунопатологии НИИФКИ для лечения стволовыми клетками, где был установлен диагноз – болезнь Вильсона-Коновалова с преимущественным поражением печени с исходом в цирроз печени, класс В по Чайлд-Пью (9 баллов). В возрасте 18 лет в ноябре 2017 г. проведена трансплантация печени. При обследовании в клинике НИИ медицинской генетики было

выявлено повышение уровня трансаминаз до 200-400 Ед/л. Данные осмотра: наблюдается тремор рук, скандированная речь. По результатам массового параллельного секвенирования обнаружены 2 мутации: частая мутация с.3207С>А и нонсенс-мутация с.2605G>Т в 14 экзоне, приводящая к возникновению стоп-кодона в 869 кодоне, кодирующем глицин (р.G869X), что приводит к потере нормальной функции белка либо посредством его укорочения, либо разрушение мРНК из-за нонсенс-опосредованного распада.

У сестры пробанда (Пациент 3.2) повышение уровня трансаминаз (до 200-400 Ед/л) впервые было выявлено в возрасте восьми лет. В результате секвенирования обнаружена частая мутация с.3207С>А и нонсенс мутация с.2605G>Т:р.G869X, подтвержденные прямым секвенированием по Сэнгеру. Вариант с.2605G>Т (chr13:51950132С>А, rs191312027) зарегистрирован в контрольной выборке gnomAD с общей частотой 0,0004007% (1/249580), европейской 0,0008827% (1/113290) и в базе ALFA Allele Frequency с общей частотой 0,1277% и частотой в европейских популяциях 0,1359%.

Пациентка 4.1 (возраст на момент осмотра – 24 года) в сентябре 2014 г. обратилась на прием к генетику с жалобами на слабость, сонливость, нарушения речи и менструального цикла. Был проведен биохимический анализ крови, выявивший снижение уровня меди и церулоплазмينا (церулоплазмин <0,03 г/л, медь – 7,33 мкмоль/л). Осмотр окулиста выявил кольцо Кайзера-Флейшнера. С января 2015 г. назначен пеницилламин 250 мг/сут. Направлена на молекулярно-генетическую диагностику, идентифицированы два патогенных варианта: частая мутация с.3207С>А и с.3556+1G>Т. В январе 2018 г. пациентка обратилась из-за резкого ухудшения состояния и самочувствия с жалобами на нарушение походки, речи, письма, поперхивания во время приема жидкой пищи, неловкость мелкой моторики, при волнении – «топтанье на месте» с затруднением выполнения первого шага, плаксивость, обидчивость, чувство зябкости в ногах, нарушение мочеиспускания (упускание и задержка). При осмотре выявлены: эмоциональная лабильность, гипомимия, рот слегка полуоткрыт, при глотании лёгкая дисфагия, дизартрия, походка с элементами атаксии. Ранее описанный вариант нуклеотидной последовательности с.3556+1G>Т является мутацией в каноническом 5'-сайте сплайсинга. Мутация в донорных сайтах сплайсинга приводят к удлинению вышестоящего экзона, в данном случае экзона 16. Вариант нуклеотидной последовательности зарегистрирован в базе данных ALFA Allele Frequency с общей частотой 0,003%, все зарегистрированные приходятся на европейскую популяцию (0,004%).

Пациентка 5.1 (возраст на момент осмотра – 15 лет). В течение нескольких лет была неоднократно госпитализирована в гастроэнтерологическое отделение. В возрасте 14 лет при биохимическом анализе крови выявлено повышение АЛТ и АСТ. Рекомендована консультация врача-генетика для исключения болезни накопления, в частности, болезни Вильсона-Коновалова. При секвенировании выявлена частая мутация с.3207С>А в гомозиготном состоянии.

У пациента 6.1 отягощенная наследственность по болезни Вильсона-Коновалова – у бабушки пациентки по материнской линии и у родного брата бабушки был поставлен диагноз БВК в Московском институте неврологических заболеваний РАМН. Бабушка пациентки скон-

чалась в возрасте 42 лет, ее брат умер в 52 года. Мать пациентки является гетерозиготным носителем. Родная сестра пациентки умерла в возрасте 16 лет, причина смерти: цирроз печени неуточненной этиологии, при морфологическом исследовании печени были обнаружены орсеинположительные гранулы в цитоплазме (скопление частиц меди, связанной с белком), что характерно для болезни Вильсона-Коновалова. У пациентки при массовом параллельном секвенировании выявлен ранее описанный, вероятно, патогенный вариант с.3973delC. В результате данной делеции происходит замена лейцина на триптофан в положении белка 1325 со сдвигом рамки считывания и образование терминирующего кодона через 3 кодона (p.L1325fs). Данный вариант нуклеотидной последовательности был описан в работе Г.М. Баязутдинова [4] в российской популяции, однако отсутствует в базах данных GnomAD, ExAC и 1000 геномов. Других патогенетически значимых вариантов нуклеотидной последовательности не было выявлено.

Пациент 7.1 (возраст на момент осмотра – 4 года) является дочерью пациента с болезнью Вильсона-Коновалова и не имеет активных жалоб и клинических проявлений. В анамнезе перинатальное поражение ЦНС, синдром мышечной дистонии и вегетовисцеральных нарушений. При секвенировании обнаружена частая мутация с.3207C>A в гетерозиготном состоянии.

Пациент 8.1 (возраст на момент осмотра – 25 лет) обратился к врачу-генетику с целью исключения заболеваний нарушения обмена меди. Из анамнеза: в 8 месяцев перенес серозный менингит. В возрасте 25 лет был эпилептический статус, кома 10 суток. Наблюдается у эпилептолога. При проведении МРТ головного мозга: МР-картина соответствует симметричному неспецифичному поражению базальных ядер. Других клинических признаков болезни Вильсона-Коновалова у пациента не выявлено. По данным клинико-генеалогического анализа наследственной отягощенности не выявлено. В результате массового параллельного секвенирования был выявлен ранее описанный вариант с неизвестным клиническим значением в гетерозиготном состоянии – с.*1265A>G. Данный вариант нуклеотидной последовательности выявлен у пациентов с БВК, при этом на настоящий момент не доказана его патогенетическая значимость. Вторая мутация не выявлена.

Пациент 9.1 (возраст на момент осмотра – 11 лет) активных жалоб и клинических проявлений не имеет, отец ребенка страдает болезнью Вильсона-Коновалова. Была конъюгационная желтуха легкой степени. Обследован на наличие частой мутации болезни Вильсона-Коновалова (с.3207C>A), мутаций не обнаружено. При этом гастроэнтерологом было рекомендовано исключить болезнь Вильсона-Коновалова и целиакию. По результатам проведенного контрольного исследования выявлено незначительное понижение содержания церулоплазмينا и снижение содержания меди в крови. При секвенировании обнаружена ранее описанная вероятно патогенная мутация с.3036dupC, приводящая к сдвигу рамки считывания (p.Lys1013fs) в гетерозиготном состоянии. Данная мутация также подтверждена у неродственного пациента 2.1.

Пациент 10.1 (возраст на момент осмотра – 28 лет) наблюдается в генетической клинике с 2012 г., когда впервые был поставлен диагноз. При обследовании в стационаре были описаны диффузные изменения па-

ренхимы печени, усиление сосудистого рисунка и расширение магистральных сосудов, холестаза. После лечения в динамике УЗИ-картина печени: умеренная гепатомегалия, диффузные изменения паренхимы печени в виде зернистости, умеренная спленомегалия. При массовом параллельном секвенировании выявлены варианты гена *ATP7B*, ранее описанные как вероятно патогенные – с.254G>T и с.3128T>C. Вариант нуклеотидной последовательности с.254G>T приводит к замене глицина на валин в позиции протеина 85 (p.Gly85Val). Глицин в позиции 85 является консервативным вариантом в области связывания металлов и замена глицина на валин приводит к нарушению взаимодействия *ATP7B* с *COMMD1-GST* (copper metabolism gene *MURR1* domain 1 glutathione S-transferase) [9]. Вариант с.3128T>C приводит к замене лейцина на пролин в позиции 1043 (p.Leu1043Pro). Ранее данный вариант был описан у пациентов с диагнозом болезнь Вильсона-Коновалова в Индии, Великобритании, Сардинии и имеет частоту 0.007% в базе данных ALFA Allele Frequency. В работе 2010 г. с помощью функционального анализа было показано, что данный вариант приводит к нарушению функции белка [10]. Вариант с.254G>T отсутствует в базах данных ExAC, gnomAD, 1000 геномов и алгоритмы предсказания патогенности расценивают данный вариант как вероятно патогенный. Вариант нуклеотидной последовательности с.3128T>C был ранее описан у пациентов с болезнью Вильсона-Коновалова в Турции и у выходцев из Пакистана, проживающих в Великобритании.

Заключение. Патогенетически значимый вариант нуклеотидной последовательности *ATP7B*: с.3207C>A: p.His1069Gln оказался самым часто встречающимся вариантом (50%) у пациентов с болезнью Вильсона-Коновалова в Томской области, что соответствует данным по частоте в Европе и Российской Федерации. Доля мутации с.3207C>A в Центральной, Восточной и Западной Европе варьирует в пределах 30–72%, а в России она составляет 50% [6]. Также была обнаружена мутация с.3036dupC, приводящая к образованию преждевременного стоп-кодона (p.Lys1013fs), вероятно, являющаяся эндемичной для российских больных.

Таким образом, удалось установить причину заболевания и подтвердить клинический диагноз БВК у 6 пациентов. Ещё у 9 обследованных удалось обнаружить одну мутацию в гене *ATP7B*. Очевидно, что в группе с одной выявленной мутацией присутствуют как носители, так и пациенты с возможной локализацией второй мутации в некодирующих регуляторных регионах *ATP7B*. У части обследованных пациентов отмечались только изменения биохимических показателей крови и отсутствовали клинические симптомы заболевания, также были обследованы родственники пробандов без клинических проявлений для исключения наличия мутаций. В группе пациентов с одной выявленной мутацией и с клиническими проявлениями необходимо проведение дополнительных исследований для поиска мутаций в регуляторных и некодирующих регионах гена *ATP7B*.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 3, 7-10 см. REFERENCES)

1. Асанов А.Ю., Соколов А.А., Волгина С.Я., Горячева Л.Г., Густов А.В., Иванова-Смоленская И.А. и др. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению болезни Вильсо-

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

- на-Коновалова (гепатолентикулярная дегенерация). СПб: Литография СПб; 2015.
4. Баязутдинова Г.М., Шагина О.А., Поляков А.В. Мутация с.3207С>А гена АТР7В – наиболее частая причина гепатолентикулярной дегенерации в России: частота и причина распространения. *Медицинская генетика*. 2018; 17(4):25-30.
 5. Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б., Коновалов Ф.А., Масленников А.В., Степанов В.А. и др. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2). *Медицинская генетика*. 2019; 18(2):3-23.
 6. Баязутдинова Г.М., Шагина О.А., Карунас А.С., Вялова Н.В., Соколов А.А., Поляков А.В. Спектр мутаций в гене АТР7В у российских больных с болезнью Вильсона-Коновалова. *Генетика*. 2019; 55(12):1433-41.
 4. Bayazutdinova G.M., Shchagina O.A., Polyakov A.V. The study of common mutation p.H1069Q in АТР7В gene in Russian WD-patients. *Meditsinskaya genetika*. 2018; 17(4):25-30. (in Russian)
 5. Ryzhkova O.P., Kardymon O.L., Prokhorchuk E.B., Konovalov F.A., Maslennikov A.B., Stepanov V.A. et al. Guidelines for the interpretation of massive parallel sequencing variants (edition 2018, versiya 2). *Meditsinskaya genetika*. 2019; 18(2):3-23. (in Russian)
 6. Bayazutdinova G.M., Shchagina O.A., Karunas A. S., Vyalova N. V., Sokolov A. A., Polyakov A. V. Spectrum of Mutations in the АТР7В Gene in Russian Patients with Wilson's Disease. *Genetika*. 2019; 55(12):1433-41. (in Russian)
 7. Rodriguez-Granillo A., Sedlak E., Wittung-Stafshede P. Stability and АТР Binding of the Nucleotide-binding Domain of the Wilson Disease Protein: Effect of the Common H1069Q Mutation. *Journal of Molecular Biology*. 2008; 383 (5): 1097-1111. DOI: 10.1016/j.jmb.2008.07.065.
 8. Mariya S. Balashova, Inna G. Tuluzanovskaya, Oleg S. Glotov, Andrey S. Glotov, Yury A. Barbitoff, Mikhail A. Fedyaev et al. The spectrum of pathogenic variants of the АТР7В gene in Wilson disease in the Russian Federation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2020; 59: 126420. ISSN 0946-672X. DOI: 10.1016/j.jtemb.2019.126420.
 9. de Bie P., van de Sluis B., Burstein E. et al. Distinct Wilson's disease mutations in АТР7В are associated with enhanced binding to COMMD1 and reduced stability of АТР7В. *Gastroenterology*. 2007; 133(4):1316-26. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.07.020.
 10. Luoma L.M., Deeb T.M., Macintyre G., Cox D.W. Functional analysis of mutations in the АТР loop of the Wilson disease copper transporter, АТР7В. *Hum. Mutat*. 2010; 31(5):569-77. DOI: 10.1002/humu.21228. PMID: 20333758.

REFERENCES

1. Asanov A.Yu., Sokolov A.A., Volgina S.Ya., Goryacheva L.G., Gustov A.V., Ivanova-Smolenskaya I.A. et al. Federal clinical guidelines for the diagnosis and treatment of Wilson-Konovalov disease (hepatolenticular degeneration). St.Petersburg: Litografiya SPb; 2015. (in Russian)
2. Rodriguez-Castro K.I., Hevia-Urrutia F.J., Sturniolo G.C. Wilson's disease: A review of what we have learned. *World J. Hepatol*. 2015 Dec 18; 7(29):2859-70. DOI: 10.4254/wjh.v7.i29.2859.
3. Cocos R., Sendroiu A., Schipor S., Bohltea L.C., Sendroiu I., Raicu F. Genotype-Phenotype Correlations in a Mountain Population Community with High Prevalence of Wilson's Disease: Genetic and Clinical Homogeneity. *PLoS ONE*. 2014; 9(6): e98520. DOI: 10.1371/journal.pone.0098520.