

ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ШИМАНСЬКА ІВАННА ЄЛИСЕЇВНА

УДК: 575.224.2:616.36-004.1

ДИСЕРТАЦІЯ

Мутації гена *ATP7B* у пацієнтів з ідіопатичними гепатобіліарними
порушеннями та хворобою Вільсона

091 – біологія

Подається на здобуття наукового ступеня
Доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ І.Є. Шиманська

Наукові керівники – Макух Галина Василівна, доктор біологічних наук,
провідний науковий співробітник,

Федоренко Віктор Олександрович, доктор біологічних
наук, професор.

Львів – 2022

АНОТАЦІЯ

***Шиманська І.Є.* Мутації гена *ATP7B* у пацієнтів з ідіопатичними гепатобіліарними порушеннями та хворобою Вільсона – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – біологія (09 «біологія»). – Державна установа "Інститут спадкової патології Національної академії медичних наук України", Львів, 2022. – Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів, 2022.

Робота присвячена дослідженню спектру та частоти алельних варіантів гена *ATP7B* серед осіб з підозрою хвороби Вільсона з України, а також покращенню виявлення випадків хвороби Вільсона шляхом розробки та впровадження оптимального алгоритму тестування мажорних мутацій генів-кандидатів гепатобіліарних порушень в осіб молодого віку. Для диференційної діагностики ідіопатичних гепатобіліарних порушень проводили генотипування мажорних мутацій генів *HFE* та *UGT1A1*. Також встановлено їх частоту та внесок в етіологію гепатобіліарних порушень.

Хвороба Вільсона характеризується високою смертністю, однак незворотні зміни в тканинах можуть бути попереджені за умови раннього виявлення. Біохімічні тести часто є неспецифічними, та підтверджують захворювання на етапі, коли вже відбулись серйозні зміни в органах та тканинах. Лише генетичні дослідження дозволяють виявити захворювання ще до появи симптомів. Складність підтвердження хвороби Вільсона зумовлена наявністю етнічних та популяційних особливостей в спектрі та частоті патогенних варіантів гена *ATP7B*, а також гетерогенністю клінічних проявів.

Прояви моногенних захворювань гепатобіліарної системи часто не відрізняються від уражень іншої етіології, що значно ускладнює діагностику. Хвороба Вільсона, спадковий гемохроматоз, синдром Жильбера - аутосомно-

рецесивні захворювання, які зазвичай вперше виявляються лише в дорослому віці.

Алельні варіанти гена *ATP7B* мають різні частоти в окремих популяціях та етнічних групах, даних про частоту та спектр мутацій гена *ATP7B* серед пацієнтів в Україні не має. Зважаючи на наявність ефективного лікування, але відсутність вчасного виявлення через мультисистемність проявів, дуже важливо, щоб генетичні дослідження були швидкими та економічно доступними. Зробити це можна шляхом впровадження генетичного тестування найпоширеніших патогенних варіантів гена *ATP7B* в Україні.

Першим етапом дисертаційної роботи було встановлення частоти мутацій генів *ATP7B*, *HFE*, *UGT1A1* серед практично здорових осіб та серед осіб з ідіопатичними гепатобіліарними порушеннями. Молекулярно-генетичний аналіз мутації с. 3207C>A гена *ATP7B* проведено в зразках 800 практично здорових осіб, алелю A(TA)₇TAA гена *UGT1A1* серед 196 практично здорових осіб, мутацій с.845G> A та с.187C> G гена *HFE* серед 280 практично здорових осіб загальної вибірки мешканців західних областей України. В основну групу ввійшли 172 особи з гепатобіліарними порушеннями нез'ясованого генезу та 96 осіб з клінічною підозрою хвороби Вільсона, 43 особи з підозрою синдрому Жильбера. Генотипування алельного варіанту с.3207C>A гена *ATP7B* проводили методом ПЛР Ві-PASA, низькофункціонального алелю A(TA)₇TAA гена *UGT1A1* методом гетеродуплексного аналізу, алельних варіантів с.845G> A та с.187C> G гена *HFE* методом рестрикційного аналізу. У результаті даного етапу роботи встановлено частоту гетерозиготного носійства мутації с.3207C>A гена *ATP7B* (1:57, 1,75%) серед практично здорових осіб, частоту гетерозиготних носіїв мутації с. 845G>C гена *HFE* в загальній вибірці - 1:40 (2,5%). Кожен четвертий був гетерозиготним носієм алельного варіанту с.187C>G гена *HFE*. Частота гомозиготного генотипу низькофункціонального алеля (TA)₇TAA гена *UGT1A1* становить 1:9 (11,7%). Зважаючи на найвищу частоту, дослідження групи осіб з ідіопатичними гепатобіліарними порушеннями почали з генотипування низькофункціонального алелю

A(TA)₇TAA гена *UGT1A1*. Результати генотипування показали низьку інформативність даного дослідження у вибірці осіб з гепатобіліарними порушеннями нез'ясованого генезу. Далі визначали частоту алельних варіантів гена *HFE*, для яких доведено асоціацію з розвитком спадкового гемохроматозу. *HFE* генотипи с.845G>A/с.845G>A; с.187C>G/с.845G>A виявлено у 5,8% осіб з гепатобіліарними порушеннями нез'ясованого генезу.

Отже, у результаті першого етапу роботи визначено етіологічні чинники ідіопатичних гепатобіліарних порушень: мутації гена *HFE* (5,8%) та мутація с.3207C>A гена *ATP7B* (9,4%).

Наступним етапом роботи було формування секвенування кодуючої послідовності гена *ATP7B*. Секвенування проведено у 23 зразках ДНК осіб з клінічними ознаками хвороби Вільсона (три та більше балів відповідно до бальної шкали проявів захворювання).

Секвенування почали з 8-го екзону гена *ATP7B*. У чотирьох пацієнтів виявлено однакову перебудову – р.Glu770Argfs. У трьох з них мутація була в компаунд гетерозиготному стані з мажорною мутацією с.3207C>A. В однієї пацієнтки після секвенування усєї послідовності гена та детекції великих делецій та дуплікацій (MLPA) виявлено лише мутацію с.2304dupC. В одного пацієнта виявлено мутацію с.2128G>A в межах екзону 8. Мутація описана в базі даних HGMD як патогенна (rs137853285). За результатами секвенування та порівняння з референтною послідовністю, в екзоні 9 гена не виявлено перебудов у жодному із зразків ДНК. Секвенування цієї ділянки гена не є інформативне для досліджуваної популяції. У межах екзона 13 виявлено заміну аденіну на цитозин в положенні 3011 (с.3011A>C). У двох осіб в межах екзона 13 виявлено заміну аденіну на цитозин в положенні 2973 кДНК (с.2973A>C). Цей варіант не веде до зміни послідовностей амінокислот у білку і трактується у базах даних як однонуклеотидний поліморфізм rs1801248. Також, виявлено дві особи із заміною гуаніну на аденін в положенні 3009 гена *ATP7B* (с.3009G>A) в гетерозиготному стані (rs1801247). В межах езону 13 виявлено

три алельні варіанти. У двох осіб в межах екзона 15 виявлено мутацію c.3402delC.

Відповідно до отриманих результатів секвенування екзона 10 гена *ATP7B*, виявлено міссенс заміну c.2495A>G в гетерозиготному стані у 6 пацієнтів, та у двох осіб в гомозиготному стані. У результатів секвенування з 16 по 21 екзонів гена *ATP7B* в досліджуваних зразках ДНК пацієнтів відмінностей від референтної послідовності гена не виявлено. Не виявлено відмінностей від референтної послідовності у межах екзонів 1, 2, 11 та 12 гена *ATP7B*. В межах екзона 3 гена *ATP7B* в чотирьох осіб виявлено однонуклеотидний поліморфізм c.1366C>G (AG[C/T]GT) rs1801244 - заміну амінокислоти валіну на лейцин в положенні 456 в гетерозиготному стані, у трьох - в гомозиготному стані. Також виявлено варіант в 4 екзоні c.1551C>T, який на сьогодні не описаний. У результаті роботи не встановлено перебудов у екзонах 5, 6 та 7.

Отримані результати секвенування вказують на те, що окрім переважаючої мутації c.3207C>A гена *ATP7B* серед даної вибірки осіб ідентифіковано чотири інші патогенні варіанти, що виявлялись у екзонах 8, 13 та 15. У третини пацієнтів при відсутності патогенних алелів в екзонних послідовностях гена *ATP7B* виявлено один чи декілька однонуклеотидних поліморфізмів нейтрального значення.

З огляду на вище зазначені дані, впровадження в практику виявлених частих варіантів гена *ATP7B* дозволить скоротити час та підвищити ефективність проведення лабораторного дослідження та зробить його доступним. Зважаючи на виявлені в роботі випадки хвороби Вільсона у дітей, необхідно підвищити настороженість окрім терапевтів, педіатрів, дитячих гастроентерологів, інфекціоністів щодо діагностики хвороби Вільсона в тому числі в дитячому віці, зважаючи на доступність патогенетичної терапії.

Апробовано різні молекулярно-генетичні підходи для генотипування фрагмента промотора гена *UGT1A1*, та фрагментів 8 та 14 екзонів гена *ATP7B* для швидкої та економічно вигідної діагностики. Встановлено внесок мутацій

гена *ATP7B*, *HFE* та *UGT1A1* в етіологію ідіопатичних гепатобіліарних захворювань в осіб молодого віку.

З часу впровадження в практику генетичного тестування переважаючої мутації с.3207C>A гена *ATP7B*, на основі наших результатів, фахівцями відповідного профілю підтверджено діагноз у 27 з 96 осіб з підозрою хвороби Вільсона. Слід відзначити, що у третині випадків хворобу діагностовано в дитячому віці.

Отримані результати вказують на доцільність впровадження в практику генетичного тестування частих патогенних варіантів гена *ATP7B*. Вважаємо доцільним проведення генетичного тестування з метою визначення етіологічних чинників гепатобіліарних порушень, відповідно до сформованого за результатами дослідження алгоритму.

Наукова новизна одержаних результатів полягає в тому, що:

- Встановлено частоту гетерозиготного генотипу за мутацією с.3207C>A гена *ATP7B* серед загальної вибірки мешканців західних областей України (1:57, 1,75%).

- Показано, що міссенс-заміна с.3207C>A в гені *ATP7B* є мажорною для осіб з хворобою Вільсона в Україні; частота цього алелю серед генетично підтверджених випадків становить 82,6%.

- За результатами секвенування кодуючої послідовності вперше описано спектр мутацій гена *ATP7B*, характерних для пацієнтів з хворобою Вільсона з України.

- Показано, що прогнозована на основі отриманих результатів частота випадків хвороби Вільсона в Україні становить 1:13061, і є в двічі вищою, ніж опубліковані дані.

Практичне значення одержаних результатів.

- Впроваджено молекулярно-генетичну діагностику частих мутацій гена *ATP7B* методом ПЛР Ві-PASA та аналізом ПДРФ.

- У результаті впровадження генетичного тестування мажорних мутацій гена *ATP7B* у 27 осіб виявлено генотип, асоційований з хворобою Вільсона, серед них у 9 в дитячому віці та у 3 на доклінічній стадії.

- Запропоновано алгоритм генетичного тестування генів-кандидатів ідіопатичних гепатобіліарних порушень.

- Отримані результати вказують на вищу очікувану частоту генотипу хвороби Вільсона, її гіподіагностику та потребу інформування лікарів щодо цієї генетичної хвороби в усіх випадках ідіопатичних гепатобіліарних порушень в осіб молодого віку.

- За результатами роботи видано інформаційний лист «Генетичне тестування мажорних мутацій гена *ATP7B* для пацієнтів з клінічними ознаками хвороби Вільсона» (Рішення Вченої Ради ДУ «ІСП НАМН України» № 10 Від 4 жовтня 2021).

Ключові слова: ген *ATP7B*, ген *HFE*, ген *UGT1A1*, гепатобіліарна система, автоімунний гепатит, хвороба Вільсона, синдром Жильбера, спадковий гемохроматоз, моногенні захворювання, генетична діагностика, медико-генетичне консультування.

ANNOTATION

Shymanska I.Ye. Mutations of the *ATP7B* gene in patients with idiopathic hepatobiliary disorders and Wilson's disease - Qualifying research paper on the rights of the manuscript.

The dissertation for obtaining the scientific degree of Doctor of Philosophy in specialty 091 - biology (09 "biology"). – State Institution "Institute of Hereditary Pathology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine" Lviv, 2022. – Ivan Franko National University of Lviv, 2022.

The work is dedicated to the study of the spectrum and frequency of allelic variants of the *ATP7B* gene among people with suspected Wilson's disease from Ukraine, as well as to the improvement of the diagnosis of Wilson's disease by

developing and implementing an optimal algorithm for testing major mutations of candidate genes for hepatobiliary disorders in young people. For the differential separation of idiopathic hepatobiliary disorders, genotyping of major mutations of the *HFE* and *UGT1A1* genes was performed. Their frequency and contribution to the etiology of hepatobiliary disorders have also been established.

Wilson's disease is characterized by high mortality, but irreversible tissue changes can be prevented if detected early. Laboratory tests are non-specific and detect the disease when there have already been serious changes in the teeth and gums. Only genetic studies can detect the disease even before symptoms appear. The difficulty of confirmation is caused by the presence of ethnic and population characteristics in the spectrum and frequency of pathogenic variants of genes, as well as the heterogeneity of clinical manifestations.

Manifestations of monogenic diseases of the hepatobiliary system often do not differ from lesions of other etiologies, which greatly complicates diagnosis. Wilson disease, hereditary hemochromatosis, and Gilbert syndrome are autosomal recessive diseases that are usually first detected in adulthood.

Allelic variants of the *ATP7B* gene have different frequencies in individual populations and ethnic groups. There is no data on the frequency and spectrum of mutations of the *ATP7B* gene among patients in Ukraine. Given the availability of effective treatment but lack of early detection due to multisystemic manifestations, it is critical that genetic testing be rapid and cost-effective. This can be done by implementing genetic testing of the most common pathogenic variants of the *ATP7B* gene in Ukraine.

The first stage of the dissertation was to establish the frequency of *ATP7B*, *HFE*, and *UGT1A1* gene mutations among practically healthy individuals and individuals with idiopathic hepatobiliary disorders. Molecular genetic analysis of the *ATP7B* gene mutation c. 3207C > A was performed in 800 practically healthy individuals; the A (TA) 7TAA allele of the *UGT1A1* gene in 196 practically healthy individuals; and the *HFE* gene mutations c.845G > A and c.187C > G in 280 practically healthy individuals from the Western regions of Ukraine. The main groups

included 172 people with hepatobiliary disorders of unknown origin, 96 people with clinical suspicion of Wilson's disease, and 43 people with a suspicion of Gilbert syndrome. Genotyping of the allelic variant c.3207C > A of the *ATP7B* gene was performed by the Bi-PASA PCR method; the low-functional allele A (TA) 7TAA of the *UGT1A1* gene by the heteroduplex analysis method; and the allelic variants c.845G > A and c.187C > G of the *HFE* gene by the restriction analysis method. As a result of this stage of the work, the frequency of heterozygous carriers of the c.3207C > A mutation of the *ATP7B* gene was established (1:57, 1.75%) among practically healthy individuals, and the frequency of heterozygous carriers of the c.845G > C mutation of the *HFE* gene in the total sample was 1:40 (2.5%). Every fourth person was a heterozygous carrier of the c.187C > G allelic variant of the *HFE* gene. The frequency of the homozygous genotype of the low-functioning allele (TA) 7TAA of the *UGT1A1* gene is 1:9 (11.7%). Considering the highest frequency, the study of a group of individuals with idiopathic hepatobiliary disorders began with genotyping of the low-functioning allele A (TA) 7TAA of the *UGT1A1* gene. The results of genotyping showed the low informativeness of this study in a sample of people with hepatobiliary disorders of unknown origin. The next step of the study was to establish the frequency of pathogenic genotypes of the *HFE* gene. The pathogenic genotypes of the *HFE* gene were found in 5.8% of the population. As a result of the first stage of work, the etiological factors of idiopathic hepatobiliary disorders were determined: mutations of the *HFE* gene (5.8%) and c.3207C > A mutation of the *ATP7B* gene (9.4%).

The next stage of the work was the sequencing of the coding sequence of the *ATP7B* gene. Sequencing was performed on 23 DNA samples of individuals with clinical signs of Wilson's disease (three or more points according to the point scale of disease manifestations).

Sequencing began with the 8th exon of the *ATP7B* gene. The same rearrangement was found in four patients - p.Glu770Argfs. In three of them, the mutation was in the compound heterozygous state with the major mutation c.3207C > A. In one patient, after sequencing the entire gene sequence and detecting large

deletions and duplications (MLPA), only the c.2304dupC mutation was detected. One patient has a c.2128G > A mutation within exon 8. The mutation is described in the HGMD database as pathogenic (rs137853285). According to the results of sequencing and comparison with the reference sequence, no rearrangements were detected in exon 9 of the gene in any of the DNA samples. Sequencing this region of the gene is not informative for the studied population. Within exon 13, the replacement of adenine with a cytosine at position 3011 (c.3011A > C) was detected. In two individuals, an adenine to cytosine substitution was found within exon 13 at position 2973 cDNA (c.2973A > C). This variant does not lead to a change in the amino acid sequences in the protein and is interpreted in the databases as a single nucleotide polymorphism, rs1801248. Also, two individuals with a substitution of guanine for adenine at position 3009 of the *ATP7B* gene (c.3009G > A) were found in the heterozygous state (rs1801247). Three allelic variants were found within exon 13. The c.3402delC mutation was detected in two individuals within exon 15.

According to the results of the sequencing of exon 10 of the *ATP7B* gene, the missense substitution c.2495A > G was detected in the heterozygous state in six patients and two individuals in the homozygous state. In the results of sequencing from 16 to 21 exons of the *ATP7B* gene in the studied DNA samples of patients, no differences from the reference sequence of the gene were found. There are no differences from the reference sequence within exons 1, 2, 11, and 12 of the *ATP7B* gene. Within exon 3 of the *ATP7B* gene, a single-nucleotide polymorphism c.1366C > G (AG [C/T] GT) rs1801244 was found in four individuals; substitution of the amino acid valine for leucine at position 456 in the heterozygous state and three in the homozygous state. A variant c.1551C > T in exon 4, which has not been described to date, was also detected. As a result of the work, no rearrangements were found in exons 5, 6, and 7.

The obtained sequencing results indicate that in addition to the predominant c.3207C > A mutation of the *ATP7B* gene, four other pathogenic variants were identified among this sample of individuals, which were detected in exons 8, 13, and 15. In a third of patients, in the absence of pathogenic alleles in the exon sequences of

the *ATP7B* gene, one or more single-nucleotide polymorphisms of neutral value were detected.

Taking into account the above data, the implementation of the detected frequent variants of the *ATP7B* gene into practice will reduce the time and increase the efficiency of laboratory research and make it available. Taking into account the cases of Wilson's disease in children found in the work, it is necessary to increase the alertness of therapists, pediatricians, children's gastroenterologists, and infectious disease specialists regarding the diagnosis of Wilson's disease, including in childhood, taking into account the availability of pathogenetic therapy.

Various molecular genetic approaches were tested for genotyping the promoter fragment of the *UGT1A1* gene and fragments of exons 8 and 14 of the *ATP7B* gene for quick and cost-effective diagnosis. The contribution of *ATP7B*, *HFE*, and *UGT1A1* gene mutations to the etiology of idiopathic hepatobiliary diseases in young people was established.

Since the introduction into the practice of genetic testing of the prevalent for our population c.3207C > A mutation of the *ATP7B* gene, based on our results, specialists of the relevant profile have confirmed the diagnosis of a third of people with suspected Wilson's disease. Among all cases, less than a third were diagnosed in childhood.

The obtained results indicate the expediency of implementing genetic testing of frequent pathogenic variants of the *ATP7B* gene into practice. According to the algorithm formed based on the results of the study, we consider it expedient to carry out genetic testing to determine the etiological factors of hepatobiliary disorders.

The scientific novelty of the obtained results is that:

The frequency of the c.3207C > A heterozygous genotype mutation of the *ATP7B* gene among the general sample of residents from the western regions of Ukraine was established (1:57, 1,75%).

- It is shown that the missense mutation c.3207C > A in the *ATP7B* gene is major for people with Wilson's disease in Ukraine; the frequency of this allele among genetically confirmed cases is 82.6%.

- According to the results of the sequencing of the coding sequence, the spectrum of mutations of the *ATP7B* gene, characteristic of patients with Wilson's disease from Ukraine, was described for the first time.

- It is shown that the predicted frequency of Wilson's disease in Ukraine is 1:13061 based on the obtained results and is twice as high as the published data.

The practical significance of the obtained results.

- Molecular genetic diagnosis of frequent mutations of the *ATP7B* gene PCR by Bi-PASA and analysis of RFLP was introduced.

- As a result of the introduction of genetic testing for major mutations of the *ATP7B* gene, the genotype associated with Wilson's disease was found in 27 people, among them 9 in childhood and 3 in the preclinical stage.

- An algorithm for genetic testing of candidate genes for idiopathic hepatobiliary disorders is proposed.

- The obtained results indicate a higher expected frequency of the genotype of Wilson's disease, is underdiagnosis, and the need to inform doctors about this genetic disease in all cases of idiopathic hepatobiliary disorders in young people.

- According to the results, and information sheet "Genetic testing of major mutations of the *ATP7B* gene for patients with clinical signs of Wilson's disease" was issued (Decision of the Scientific Council of the SI "IHP NAMS of Ukraine" No. 10. October 4, 2021).

Keywords: *ATP7B* gene, *HFE* gene, *UGT1A1* gene, hepatobiliary system, autoimmune hepatitis, Wilson's disease, Gilbert syndrome, hereditary hemochromatosis, monogenic diseases, genetic diagnosis, medical and genetic counseling.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ,
ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у виданнях, індексованих Scopus та/або Web of Science

1. H. Makukh, I. Hayboniuk, A. Zarina, O. M. Semeriak & L. Gailite Mutations in the *ATP7B* Gene in Ukrainian Patients with High Risk of Wilson's Disease, *Cytol Genet.*, 2020, vol. 54, no. 4, pp. 324–332

Статті у фахових виданнях України

2. Гайбонюк І. Спектр і частота мутацій гена *ATP7B* в різних популяціях та етнічних групах. *Вісник Львівського національного університету ім. І. Франка*. 2019. № 80. С. 3-12.

3. Гайбонюк І.Є., Макух Г.В. Аналіз низько функціональної алелі 7(ТА) гена *UGT1A1* серед вибірки практично здорових осіб Західного регіону України. *Вісник Харківського національного університету ім В.Н. Каразіна, серія біологічна*. 2019. № 33. С.28-34.

4. Гайбонюк І.Є., Макух Г.В., Тиркус М.Я., Третяк Б.І., Яджин Л. М. Мутації Н1069Q гена *ATP7B* та С282У та Н63D гена *HFE* в осіб з гепатобіліарними захворюваннями нез'ясованого генезу. *Вісник проблем біології і медицини*. 2019. № 3 (152). с. 227-231.

5. Гайбонюк І.Є., Кравченко С.А., Макух Г.В., Дац–Опока М.І., Пампуха В.М., Третяк Б.І., Кіселик І.О. Частота асоційованого з синдромом Жильбера низько функціонального алелю 7(ТА) гена *UGT1A1* (rs8175347) в Україні. *Вісник проблем біології і медицини*. 2020.

Публікації, що засвідчують апробацію матеріалів дисертації

6. Макух Г., Гайбонюк І., Перші результати генетичної діагностики хвороби Вільсона. Науково-практична конференція «Муковісцидоз в Україні: стан та перспективи діагностики, лікування й соціальної адаптації пацієнтів» із симпозіумом «Орфанні захворювання у дітей та дорослих». Львів. 2017.

7. Гайбонюк І., Макух Г.В., Завгородня Н.Г., Лук'яненко О.Ю., Семеряк О. Результати генетичної діагностики мутацій гена *ATP7B* серед осіб високого ризику хвороби Вільсона. Міжнародна науково-практична конференція молодих вчених, присвячена 25-ти річчю національної академії медичних наук України. Київ. 2018. 108-109.

8. Гайбонюк І.Є., Макух Г.В., Генетична діагностика при ураженнях гепатобіліарної системи нез'ясованого генезу. XVI-й Міжнародній конференції студентів, молодих вчених та фахівців, присвячена 25-річчю від дня відродження кафедр внутрішньої медицини, внутрішніх хвороб, загальної та клінічної імунології та алергології медичного факультету Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна. Харків. 2019. 64-65.

9. Haiboniuk I., Zarina A., Rots D., Gailite L., Makukh H., Kovaliv I. The results of genetic diagnostic of *ATP7B* gene mutations among individuals with high-risk of Wilson's disease. ESHG Conference, Gothenburg. Sweden. 2019.

10. Макух Г.В., Гайбонюк І., Семеряк О., Яджин Л.М. Результати генетичної діагностики хвороби Вільсона-Коновалова. Київ, 2019.

11. I. Haiboniuk, M. Dats-Opoka, H. Makukh, Ya. Wojko, I. Kiselyk. Genetic diagnostics and clinical features of Wilson's disease in children. *EUREKA. Life sciences*. 2020. Vol.2. P. 3-9.

12. Haiboniuk I., Makukh H., Zarina A., Gailite L. The molecular-genetic diagnostic of Wilson's disease among patients from Ukraine. 5th annual international Remote Conference science and society. Canada. 2020. P.109-110.

13. Ivanna Haiboniuk, Nataliya Kitsera, Zoriana Osadchuk, Bogdan Tretyak, Halyna Makukh. Frequency of the HFE gene mutation C282Y and

H63D in patients with hepatobiliary disease from Lviv region. *J Sci Discov* (2021); 5(2): jsd21005.

14. I. Shymanska, M. Tyrka, D. Zastawna, H. Makukh, M. Tyrkus. Approach of HRM analysis for *ATP7B* gene common variants screening. ESHG conference, Vienna, Austria.2022. E-P16-007.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	20
РОЗДІЛ 1.....	27
Особливості генетичної діагностики моногенних хвороб, які проявляються ураженнями гепатобіліарної системи.....	27
1.1. Особливості кореляції генотип-фенотип при моногенних хворобах, які проявляються ураженнями гепатобіліарної системи в осіб молодого віку	28
1.1.1. Зв'язок фенотипу й генотипу при хворобі Вільсона	29
1.1.3. Можливості генетичної діагностики спадкового гемохроматозу	32
1.1.4. Роль мутацій гена <i>SERPINA</i> у розвитку дефіциту альфа 1 антитрипсину (ААТ)	33
1.1.5. Характеристика рідкісних моногенних хвороб, пов'язаних із ураженням гепатобіліарної системи	34
1.2. Алельні варіанти гена <i>ATP7B</i> та їх фенотипові прояви	35
1.3. Структура гена <i>ATP7B</i> та роль його білкового продукту	37
1.3.1. Характеристика мутацій гена <i>ATP7B</i> та їх частота в різних популяціях та етнічних групах	40
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	54
2.1. Матеріали дослідження.....	54
2.1.1. Характеристика осіб обстежених груп.....	54
2.1.3. Реагенти та робочі розчини.....	57
2.2. Методи дослідження	61
2.2.1. Молекулярно-генетичні методи дослідження.....	61
2.2.3 Популяційно-генетичний аналіз	73
РОЗДІЛ 3.....	74
РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	74
3.1 Частота алельних варіантів генів-кандидатів ідіопатичних гепатобіліарних порушень серед практично здорових осіб	74

3.1.1. Аналіз частоти алелів та генотипів варіанту с.3207C>A гена <i>ATP7B</i> серед вибірки практично здорових жителів Західної України	74
3.1.2 Аналіз частоти та генотипів мутацій с.845G> A та с.187C> G гена <i>HFE</i> серед вибірки практично здорових мешканців західних областей України	80
3.1.3. Частота низько функціонального алелю A(TA) ₇ TAA гена <i>UGT1A1</i> серед практично здорових осіб.....	84
3.2. Молекулярно-генетичний аналіз алельних варіантів генів-кандидатів ідіопатичних гепатобіліарних порушень серед осіб дослідної групи	89
3.3 Результати секвенування послідовності гена <i>ATP7B</i> серед осіб високого ризику розвитку хвороби Вільсона.	99
3.4 Ефективність впровадження в практику генетичного тестування мутацій с.3207C>A та с.2304dupC гена <i>ATP7B</i> серед осіб із підозрою хвороби Вільсона.	114
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	136
ДОДАТКИ	151

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

dNTP	Суміш дезоксирибонуклеотид трифосфатів
SDS	Додецилсульфат натрію
АЛТ	Аланін аміно трансфераза
АСТ	Аспартат аміно трансфераза
ЛФ	Лужна фосфатаза
ДНК	Дезоксирибонуклеїнова кислота
ЕДТА	Етилендіамінтетраацетат натрію
мекв/л	Міліеквівалент на літр
мкг/мкл	Мікрограм на мікролітр
ммоль/л	Мілімоль на літр
п.н.	Пара нуклеотидів
ПДРФ	Поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів
ПЛР	Полімеразна ланцюгова реакція
ПААГ	Поліакрил амідний гель
СГХ	Спадковий гемахроматоз
ТВЕ	Трис бор ЕДТА буфер
TRIS	Гідроксиметилметиленамін
ТЕ	Трис-ЕДТА буфер
ХВ	Хвороба Вільсона
КГ	Контрольна група
ДГ	Дослідна група
МГК	Медико-генетичний кабінет
МГЦ	Медико-генетичний центр
УЗД	Ультразвукове дослідження
ОКЛ	Обласна клінічна лікарня
ЛОКЛ	Львівська обласна клінічна лікарня
МОЗ	Міністерство охорони здоров'я
НАМН	Національна академія медичних наук

ATP7B	Ген мідь зв'язуючої АТФази Р типу
HFE	Ген регулятора гомеостазу Fe
HWE	Рівновага Харді-Вайнберга
UGT1A1	Ген уридин дифосфо-глюкуронизил трансферази
АТФ	Аденозин три фосфат
Cu	Купрум
Fe	Ферум
HRM	Плавлення з високою роздільною здатністю
SNP	Однонуклеотидний поліморфізм

ВСТУП

Знання про структуру ДНК та функціонування відповідних білкових продуктів є ключовим для розробки механізмів їх корекції. Завдяки цим знанням для багатьох генетичних патологій розроблено ефективне лікування, одною з них є хвороба Вільсона. Це аутосомно-рецесивне захворювання яке характеризується високою смертністю, однак незворотні зміни в тканинах можуть бути попереджені за умови ранньої діагностики та лікування. Тому, основні зусилля слід спрямувати на розробку та широке впровадження доступного генетичного дослідження мутацій гена мідь зв'язуючої АТФази Р-типу (*ATP7B*), які зумовлюють порушення гепатоцелюлярного метаболізму міді.

Дискусійним залишається питання поширеність хвороби Вільсона в світі, й в Україні, зокрема. Опубліковані в літературі дані щодо поширеності цього захворювання ґрунтувалися, зазвичай, на даних клінічно діагностованих випадків, і становлять від 1:30–50 000 до 1:200 000. Згідно мета-аналізу генетичних досліджень, частота генотипу, який асоційований з ХВ є в 25 разів вищою - 13,9:100 000, або 1:7194 [Gao J, 2019]. Суперечливою є інформація про частоту здорових гетерозиготних носіїв мутацій гена *ATP7B*, значення якої й визначає поширеність цього генетичного захворювання в популяції.

Повідомлення про ХВ з України обмежені описом поодиноких клінічних випадків, як знахідок [146, 150]. Існує ґрунтовний опис результатів тривалого спостереження за групою пацієнтів з ХВ [136], переважно з неврологічними симптомами. Проте, за даними окремих досліджень, у стаціонарах гастроентерологічного профілю частка ХВ серед пацієнтів із хронічним ураженням печінки може досягати 7 % [наказ МОЗ №769, 2016]. Незважаючи на те, що перші симптоми з'являються у дитинстві або в ранній юності, діагностувати хворобу Вільсона на ранніх етапах є важко. Окрім генетичної діагностики немає тесту для діагностування досимптомних проявів ХВ. В Україні не створено єдиного реєстру пацієнтів із ХВ, немає даних про

очікувану частоту гетерозиготних носіїв хвороби, що потребує окремого дослідження. Також, актуальним питанням є запровадження диференційної діагностики ХВ з іншими генетичними хворобами, які проявляються гепатобіліарними порушеннями в осіб молодого віку. До них належать спадковий гемохроматоз та синдром Жильбера, які спричинені мутаціями гена *HFE* та гена *UGT1A1* відповідно.

У світі виявлено понад 600 патогенних варіантів у межах двадцяти одного екзону та двадцяти інтронів гена *ATP7B* та про нові алельні варіанти повідомляють у всьому світі [39]. Алельні варіанти гена *ATP7B* мають різну частоту в окремих популяціях та етнічних групах. Не існує даних про частоту та спектр мутацій гена *ATP7B* серед пацієнтів з України, яка має стати основою алгоритму для впровадження в практику медико-генетичного консультування. Зважаючи на наявність ефективного лікування, але відсутність вчасної діагностики через мультисистемність проявів, дуже важливо щоб генетична дослідження цього захворювання була швидкою та економічно доступною. Зробити це можна шляхом впровадження генетичного тестування найпоширеніших патогенних варіантів гена *ATP7B* в конкретному регіоні.

У межах двадцяти одного екзону та двадцяти інтронів гена *ATP7B* виявлено понад 600 патогенних мутацій, й нові алелі повідомляються у всьому світі [122, 4]. Алельні варіанти гена *ATP7B* мають різні частоти в окремих популяціях та етнічних групах, даних про частоту та спектр мутацій гена *ATP7B* серед пацієнтів в Україні не має. Зважаючи на наявність ефективного лікування, але відсутність вчасної діагностики через мультисистемність проявів, дуже важливо, щоб генетичні дослідження з груп ризику була швидкою та економічно доступною. Зробити це можна шляхом впровадження генетичного тестування найпоширеніших патогенних варіантів гена *ATP7B* в Україні.

Зв'язок роботи з іншими науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана у ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України» відповідно до планів науково-дослідних робіт установи та була

фрагментом комплексних тем, які виконувалися в інституті: "Дослідження генетичних чинників обтяженого клінічного перебігу моногенних і мультифакторних захворювань" (№ держ. реєстрації 0117U000655, 2017 –2019 рр.), «Аналіз чинників ранньої діагностики генетично зумовленої патології людини на прикладі вибраних моногенних та мультифакторних хвороб» (№ держ. реєстрації 0117U000655, 2020 –2021 рр.)

Дослідження виконувалося в межах наукової співпраці відповідно до угоди між ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України» та Ризьким Медичним університетом імені П. Страдіня.

Мета роботи: Встановити спектр і частоту мутацій гена *ATP7B* серед пацієнтів з України та запропонували алгоритм визначення мутацій генів, які зумовлюють ідіопатичні гепатобіліарні порушення.

Відповідно до мети були поставлені наступні завдання дослідження:

1. Створити колекцію зразків ДНК, сформувати групи осіб з гепатобіліарними порушеннями нез'ясованого генезу та високого ризику розвитку хвороби Вільсона.

2. Визначити частоту гетерозиготного генотипу мажорної мутації с.3207C>A (H1069Q) гена *ATP7B* у загальній вибірці мешканці західних областей України та розрахувати очікувану частоту хвороби Вільсона.

3. Проаналізувати та порівняти частоту мутацій гена *ATP7B* з частотами патогенних варіантів гена *HFE* та гена *UGT1A1*

4. Провести молекулярно-генетичний аналіз мажорної мутації с.3207C>A (H1069Q) гена *ATP7B* у групі з осіб різного віку з клінічними проявами хвороби Вільсона.

5. Провести секвенування кодуючої послідовності гена *ATP7B* та визначити спектр та частоту його алельних варіантів у осіб з хворобою Вільсона з України.

6. Апробувати та порівняти різні методи молекулярно-генетичного аналізу частих мутацій генів *ATP7B*, *HFE* та *UGT1A1* й запропонувати

оптимальний алгоритм їх генетичного тестування в осіб з групи ризику гепатобіліарних порушень нез'ясованого генезу

Об'єкт дослідження: гени-кандидати гепатобіліарних уражень в людини в молодому віці.

Предмет дослідження: спектр та частота мутацій генів *ATP7B*, *HFE* та *UGT1A1* у пацієнтів з України.

Методи дослідження: молекулярно-генетичні методи: полімеразна ланцюгова реакція (класична ПЛР та її модифікації *Bi-PASA*), полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі (RT-PCR) та аналіз кривих плавлення високої роздільної здатності (HRM), методи електрофорезу, поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ), аналіз делецій\дуплікацій MLPA, прямого автоматичного секвенування за Сенгером; статистичний аналіз.

Наукова новизна одержаних результатів полягає в тому, що:

- Встановлено частоту гетерозиготного генотипу мутації с.3207C>A гена *ATP7B* серед загальної вибірки мешканців західних областей України (1:57,1,75%).

- Показано, що міссенс-заміна с.3207C>A в гені *ATP7B* є мажорною для осіб з хворобою Вільсона в Україні; частота цього алелю серед генетично підтверджених випадків становить 82,6%.

- За результатами секвенування кодуючої послідовності вперше описано спектр мутацій гена *ATP7B*, характерних для пацієнтів з хворобою Вільсона з України.

- Показано, що розрахована на основі отриманих результатів передбачувана частота випадків хвороби Вільсона становить 1:13061, і є в два рази вищою, ніж опубліковані дані.

Практичне значення одержаних результатів.

- Впроваджено молекулярно-генетичну діагностику частих мутацій гена *ATP7B* методом ПЛР *Bi-PASA* та аналізом ПДРФ.

- У результаті впровадження генетичного тестування мажорних мутацій гена *ATP7B* у 27 осіб виявлено генотип, асоційований з хворобою Вільсона, серед них у 9 в дитячому віці та у 3 на доклінічній стадії.

- Запропоновано алгоритм генетичного тестування генів-кандидатів ідіопатичних гепатобіліарних порушень.

- Отримані результати вказують на вищу очікувану частоту генотипу хвороби Вільсона, її гіподіагностику та потребу інформування лікарів щодо цієї генетичної хвороби в усіх випадках ідіопатичних гепатобіліарних порушень в осіб молодого віку.

- За результатами роботи видано інформаційний лист «Генетичне тестування мажорних мутацій гена *ATP7B* для пацієнтів з клінічними ознаками хвороби Вільсона» (Рішення Вченої Ради ДУ «ІСП НАМН України» № 10 Від 4 жовтня 2021).

Апробовано різні молекулярно-генетичні підходи для визначення алелю $A(TA)_7TAA$ гена *UGT1A1* і визначено його частоту (9,3%) в гомозиготному стані серед осіб з ідіопатичними гепатобіліарними порушеннями. Генетичне тестування мутацій $c.845G > A$ та $c.187C > G$ гена *HFE* дало змогу підтвердити діагноз спадкового гемохроматозу у 5,8% пацієнтів. Встановлено внесок спадкових мутацій гена *ATP7B*, *HFE* та *UGT1A1* в етіологію ідіопатичних гепатобіліарних захворювань в осіб молодого віку.

Особистий внесок здобувача. Автор самостійно проводив пошук та обробку літературних джерел, виділення зразків ДНК, постановки усіх молекулярно-генетичних досліджень на базі лабораторії генетичних досліджень ДУ «ІСП НАМНУ». Методики RT-PCR та HRM аналізу виконані автором особисто в НМЦ «Леоген» та університету «Ряшівська політехніка», Польща. Обробку та аналіз секвенограм автоматичного секвенування екзонів гена *ATP7B*, проведеного на базі молекулярно-генетичної лабораторії Ризького медичного університету ім. П.Страдіня. Також, автор особисто провів статистичний аналіз даних, дизайн праймерів та оцінку патогенності нових алельних варіантів за допомогою програмного забезпечення. Планування

дослідження, обговорення, інтерпретацію отриманих даних, підготовку частини публікацій до друку проводили разом з науковим керівником. Участь колег відображено спільних публікаціях з іншими авторами дисертанту належать частини, що стосуються теми дисертації. Текст написано особисто.

Подяки. Здобувач висловлює особливу подяку колективам лікарів КЗ «Львівська обласна клінічна лікарня», КЗ «Західноукраїнський дитячий спеціалізований медичний центр», КЗ «Львівської обласна дитяча клінічна лікарня «ОХМАДИТ», ДУ «Інститут гастроентерології НАМНУ» (Дніпро), та ЛНМУ ім. Д. Галицького (Львів) за проведену та надану клінічну характеристику пацієнтів.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації були представлені на 6 конференціях:

1. Науково-практична конференція «Муковісцидоз в Україні: стан та перспективи діагностики, лікування й соціальної адаптації пацієнтів» із симпозіумом «Орфанні захворювання у дітей та дорослих» (Львів, 2017) – усна доповідь;
2. Міжнародна науково-практична конференція молодих вчених, присвячена 25-ти річчю національної академії медичних наук України (Київ, 2018) – усна доповідь
3. XVI-й Міжнародній конференції студентів, молодих вчених та фахівців, присвячена 25-річчю від дня відродження кафедр внутрішньої медицини, внутрішніх хвороб, загальної та клінічної імунології та алергології медичного факультету Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна (Харків, 2019) - усна доповідь
4. ESHG Conference (Sweden, 2019) – постерна доповідь
5. 5th annual international Remote Conference science and society (Canada, 2020) – постерна доповідь (он-лайн)
6. науково-практична конференція з міжнародною участю «Проблеми спадкової та мультифакторної патології» (Київ, 2018) – усна доповідь
7. ESHG Conference (Viena, Austria, 2022) – постерна доповідь.

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 14 наукових робіт, у тому числі 7 статей у наукових фахових виданнях, із яких 4 - у затверджених переліком МОН України, 1 – в журналі Scopus, 2 – в іноземному виданні, 7 тез доповідей.

Обсяг та структура дисертації. Дисертація має 4 розділи, складається із вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, результатів власних досліджень та їх обговорення, висновків, списку використаних джерел. Дисертаційну роботу викладено на 154 сторінках друкованого тексту. Текст дисертації проілюстровано 19 таблицями та 30 рисунками. Перелік використаних літературних джерел охоплює 150 найменування, із них - 29 кирилицею та 121- латиницею.

РОЗДІЛ 1

Особливості генетичної діагностики моногенних хвороб, які проявляються ураженнями гепатобіліарної системи (огляд літератури)

Генетичні дослідження дають більше можливостей для діагностики чи прогнозування розвитку хвороби, однак збільшується ймовірність неоднозначних або неочікуваних результатів, багато з яких можуть мати вплив на безсимптомних носіїв членів сім'ї[115]. У минулому генетичні тестування рідко могли забезпечити швидку відповідь. Удосконалення методів зробили генетичну діагностику якісною, швидкою та доступною. Встановлення генетичної природи захворювання та оптимізація методів діагностики дозволяє корегувати лікування пацієнтів, які до цього вважались невиліковними.

Одним з найбільших досягнень сучасної генетики є можливість лікування багатьох генетичних захворювань. Проте, деякі з цих методів є малодоступними та дорогими. Тому не всі Особи з ознаками захворювання можуть отримати адекватне лікування. Дані, які можна отримати в ході генетичних досліджень мають великий потенціал для покращення здоров'я, але зараз ми на етапі розвитку та намагаємось вивчити як інтерпретувати варіанти невідомого значення, трактувати неочікувані результати та працювати з безсимптомними особами, який виявляємо під час сімейного скринінгу.

На сьогодні існує багато спадкових захворювань, для яких лікування є доступним. Це зокрема хвороба Вільсона (Вільсона-Коновалова-Вестфалія)[120], яка добре піддається терапії, але важко діагностується через певні особливості. Хвороба Вільсона (ХВ), в російськомовній літературі Вільсона-Коновалова або гепатоцеребральна дистрофія - одне з небагатьох аутосомно-рецесивних захворювань, для яких існує ефективна, недорога терапія [3]. Хвороба характеризується високою смертністю, однак незворотні

зміни в тканинах можуть бути попереджені за умови ранньої діагностики та лікування.

1.1. Особливості кореляції генотип-фенотип при моногенних хворобах, які проявляються ураженнями гепатобіліарної системи в осіб молодого віку

Дослідження геному людини протягом останнього десятиліття дозволили підтвердити генетичну схильність до розвитку складних порушень печінки, у виникненні яких важливу роль відіграють також екологічні чинники довкілля. Знахідки дозволили виявити патофізіологічні процеси, вказали на необхідність створення нових класифікацій захворювань печінки та пошук методів діагностики та лікування. У найближчому майбутньому генетика дозволить надалі виокремлювати захворювання печінки та сприятиме персоналізованій медицині. Існують певні обмеження щодо клінічного впровадження та інтерпретації технологій, що швидко розвиваються, але перспектива генетичних досліджень при захворюваннях печінки ілюструє можливості в майбутньому надання допомоги таким пацієнтам, шляхом розвитку персоналізованої медицини. [117].

До цих генетичних захворювань, що проявляються ураженнями гепатобіліарної системи, відноситься хвороба Вільсона, спадковий гемозроматоз, дефіцит альфа 1 антитрипсину, синдром Жильбера. Дані захворювання розвиваються через дефіцит одного білка, який або повністю, або частково втратив свою функцію. Першою страждає печінка, як основний орган, що задіяний в метаболізмі та трансформації усіх речовин, що потрапляють в організм. Гепатобіліарна система є важливою складовою травної системи, яка включає в себе печінку, підшлункову залозу, жовчні протоки та жовчний міхур, що дозволяє здійснювати такі важливі процеси, як травлення та виведення з організму продуктів метаболізму. Усі речовини, які потрапляють в печінку можуть зв'язуватись з молекулою-супутником (різні іони), можуть безпосередньо виводитись в кров (наприклад глюкоза), можуть накопичуватись в гепатоцитах для подальшого перерозподілу відповідно до потреб. За

нормального функціонування усі допоміжних механізмів печінка виконує функцію основного депо необхідних речовин та ко-факторів багатьох ферментів. Результатом її ураження стає порушення обмінних процесів, процесів детоксикації, а також імунної відповіді та антимікробного захисту. Причини гепатобіліарних порушень можуть бути різні, серед них спосіб життя, шкідливі умови праці та проживання, віруси, стреси та забруднення довкілля, а також генетичні дефекти, основними з яких є мутації генів, що призводять до рохвиту хвороби Вільсона, спадкового гемохроматозу, дефіциту альфа 1 антитрипсину, синдрому Жильбера, муковісцидозу.

1.1.1. Зв'язок фенотипу й генотипу при хворобі Вільсона

Хвороба Вільсона має декілька особливостей, які виділяють її в окреме положення та порушують класичні уявлення про неї. Першим є те, що це аутосомно-рецесивне захворювання, симптоми якого маніфестуються переважно в дорослому віці. Прояви хвороби в дорослому віці є характерні для домінантних захворювань. Друге – доступною є ефективна терапія, яка здатна зменшити та навіть зупинити прогресування хвороби [12]. Особи з ознаками захворювання з хворобою Вільсона не мають ураження зі сторони репродукційної системи, і часом можуть мати нащадків ще до встановлення у них діагнозу, що є теж більш характерно для хвороб з автосомно-домінантним типом успадкування. Тобто, при хворобі Вільсона пул мутантних генів в популяції підтримується як здоровими гетерозиготними носіями, так і за рахунок гомозигот. Автосомно-рецесивний тип спадкування більш характерний для захворювань, при яких порушена функція одного або декількох ферментів. Частота виникнення хвороб, успадкованих за автосомно-рецесивним типом, залежить від концентрації рецесивного гена в популяції і знаходиться в прямій залежності від ступеня частоти мутантного гена. Прояви автосомно-рецесивних захворювань більш однорідні і частіше діагностуються у дитячому віці. Багато зусиль покладено для розробки вчасної діагностики та ефективного лікування

моногенних автосомно-рецесивних захворювань. Зокрема розроблено методи скринінгу новонароджених, замісна терапія при певних патологіях, обмеження вживання продуктів, які містять токсичні для конкретного випадку компоненти (ФКУ, галактоземія тощо). Такі заходи високо ефективні та дуже швидко дали позитивні результати, а саме знизили смертність новонароджених, та покращили якість їх життя.

Однак, багато автосомно-рецесивних захворювань проявляються лише у дорослих, а саме: гемоглобінопатії, деякі форми гіперліпопротеїнемії, лізосомні хвороби накопичення з пізнім початком, а також захворювання, які проявляються у міру накопичення шкідливих речовин, зокрема хвороба Вільсона-Коновалова, гемохроматоз, недостатність альфа 1-антитрипсину, синдром Жильбера. Перелічені нозології зумовлені мутаціями генів, продукти яких задіяні у базовому метаболізмі, який відбувається в печінці, як основному органі для трансформації усіх речовин, що потрапляють в організм [123, 26, 82]. Гепатобіліарна система в тій чи більшій мірі є ураженою при більшості моногенних ензимопатій. Окрему групу, до якої належить хвороба Вільсона, складають хвороби, які зазвичай вперше маніфестують ураженням зі сторони гепатобіліарної системи у дорослому віці, незважаючи на автосомно-рецесивний характер успадкування [33].

1.1.2. Характеристика мутацій гена *UGT1A1* та зумовленого ним синдрому Жильбера (хвороба Мейленграхта)

Синдром Жильбера (СЖ) — спадкова некон'югаційна гіпербілірубінемія, що пов'язана зі зниженням активності уридиндифосфатглюкуронілтрансферази (УДФ-ГТ1) у печінці [16]. Розрізняють вроджений варіант та синдром, клінічні прояви якого маніфестують після перенесеного гострого вірусного гепатиту з розвитком постгепатитної гіпербілірубінемії. Хворим із постгепатитною гіпербілірубінемією слід також проводити диференційну діагностику з хронічним вірусним гепатитом [80].

Без застосування методів генетичної діагностики СЖ вважали рідкісною патологією. На даний час за оцінками епідеміологічних досліджень СЖ у світі трапляється від 5 до 10% у світовій популяції. За деякими даними кількість гетерозиготних носіїв у Європі може сягати 40% [64]. Встановлена висока частота виявлення СЖ серед населення країн Африки (36%-50%), Німеччини (11%), Шотландії (10-13%), Іспанії (9%), а низька – у країнах Азії (близько 3%) [18].

Серед хворих на СЖ переважають чоловіки, що пояснюється впливом статевих гормонів на рівень білірубіну (10:1) [77]. Гомозиготними носіями мутації є 12 % шотландців, 16-18 % європейців, 12 % індійців, 8 % єгиптян і 23 % афроамериканців [98]. Поширеність СЖ в Україні не вивчалася.

Слід зазначити, що гіпербілірубінемія може свідчити про інші захворювання зі схожим перебігом, а саме про синдром Криглера – Найара, зумовлений мутаціями гена *UGT1A1*, Дубліна-Джонса - мутаціями гена *ABCC2* та Ротора – мутаціями генів *SLCO1B1* та *SLCO1B3*) [<https://www.omim.org/entry/143500>]. Зважаючи на неспецифічність проявів єдиним прямим та специфічним тестом діагностики синдрому Жильбера є генетичне тестування мутацій гена *UGT1A1*. В межах гена описано 129 різних алельних варіантів. Одні з них частіше виявляються при синдромі Жильбера (A(TA)₇TAA та с.-3279T>G гена *UGT1A*, інші асоційовані з синдромом Криглера

– Найара (р.G71R та р.Y486D гена *UGT1A*). В літературі немає даних щодо частоти різних мутацій та алельних варіантів гена серед українців. Частота низько функціональних алелів *UGT1A1*28* в популяції впливає на частоту СЖ.

1.1.3. Можливості генетичної діагностики спадкового гемохроматозу

Спадковий гемохроматоз (СГХ) - це генетичне захворювання, при якому посилене всмоктування заліза в кишечнику може призвести до перевантаження печінки залізом. Це одне з найпоширеніших генетичних захворювань у світі, яке спричинене мутаціями гена *HFE* [92]. Захворювання успадковується за аутомно-рецесивним типом та характеризується низькою перетрантністю. За наявності мутацій гена *HFE* в гомозиготному чи компаунд гетерозиготному стані захворювання розвинеться через кілька років, залежно від рівня накопичення заліза в організмі. Найпоширеніші мутації гена *HFE* - С282У. Зміна аденіну гуаніну в позиції 845 гені *HFE*, що викликає заміну цистеїну на амінокислоту тирозином в позиції 282 [22], та Н63D - заміна цитозину на гуанін в нуклеотиді 187 гена *HFE*, що викликає заміну гістидину на аспарагін в позиції 63 [32]. Мутація С282У характеризується вищою пенетрантністю, тому у гомозигот за цією мутацією частіше розвивається захворювання, що становить понад 90 % випадків СГХ [22]. Також клінічні захворювання розвивались у компаунд гетерозиготи за мутаціями С282У/Н63D, гомозигот за мутацією Н63D, та гомозигот за мутацією S65C [64].

Фенотипова гетерогенність захворювання залежно від генотипу досліджувались в США та Канаді на вибірці понад 100 000 осіб. Встановлено, що у 10% носіїв мутації С282У у гомозиготному стані розвиваються клінічні прояви хвороби. Завдяки скринінговим дослідженням таких пацієнтів виявляють до появи симптомів. Щодо мутації Н63D, то в гомозиготних носіїв захворювання розвивається значно рідше, ніж у С282У/С282У, хоча абсолютний ризик складно охарактеризувати. За дослідженнями перевантаження залізом виявили у 4 / 60 осіб, гомозиготних за мутацією Н63D,

що становить 7%. Також немає однозначної відповіді стосовно розвитку захворювання у компаунд гетерозиготних носіїв мутацій С282У та Н63D. Захворювання розвивалось у 25% (13 / 51 обстеженого).

1.1.4. Роль мутацій гена SERPINA у розвитку дефіциту альфа 1 антитрипсину (ААТ)

ААТ є інгібітором протеази - протеолітичного ферменту еластази, а також протеаз трипсину, хімотрипсину та тромбіну [76]. Він є частиною великої групи унікальних інгібіторів серинової протеази, які називаються серпіни, які задіяні в патогенезі нейродегенеративних захворювань, ангіоневротичного набряку та порушення коагуляції, які називаються "серпінопатіями" [25]. В основному дефіцит альфа 1 антитрипсину проявляється емфіземою легенів, але в 10% усіх випадків захворювання проявляється жовтухою новонароджених та зникає на 2-4 місяць. Також захворювання може розвиватись в підлітковому віці.

Вважається, що емфізема при дефіциті ААТ (ААТD) є наслідком дисбалансу між нейтрофільною еластазою в легенях, яка руйнує еластин, та інгібітором еластази ААТ, який синтезується в гепатоцитах і захищає від протеолітичної деградації еластину [80]. Цей механізм називають "токсичною втратою функції". Зокрема, куріння сигарет та інфекція збільшують кількість еластази в легенях, тим самим збільшуючи їх ушкодження [1]. Крім того, полімери антитрипсину "Z" можуть сприяти локальному запаленню та руйнуванню тканин у легенях.

Патогенез захворювання печінки зовсім інший. Він зумовлений «токсичним посиленням функції ферменту». Захворювання печінки є наслідком накопичення в гепатоциті вільного білка ААТ. Лише ті генотипи, які пов'язані з патологічною полімеризацією ААТ в межах ендоплазматичного ретикулуму гепатоцитів (наприклад, ААТD типу P1 * ZZ), викликають захворювання [80]. Більшість пацієнтів із захворюваннями печінки, зумовленими ААТD, є гомозиготними за алелем Z (тобто P1 * ZZ). Захворювання печінки не зустрічається в гомозиготних носіїв, які мають важкий дефіцит ААТ, без

внутрішнього гепатоцитарного накопичення. ААТD успадковується за аутосомно-кодомінантним типом, що означає, що уражені особи успадкували аномальний ген ААТ від кожного з батьків. Ген, що кодує ААТ - *SERPINA1* (MIM +107400) і розташований на довгому плечі хромосоми 14.

Ідентифіковано більше 150 алелів гена ААТ (*SERPINA1*), кожен з яких має літерний позначення, яке базується на електрофоретичній рухливості трансльованого білка. Нормальний алель називають "М." Оскільки ААТ є інгібітором протеази (член сімейства білків серпіна), позначення "PI" позначає "інгібітор протеази", а букви позначають присутні алелі. Таким чином, "PI * MM" позначає гомозиготу дикого типу, тоді як PI * ZZ позначає гомозиготність для алеля Z, найпоширенішої мутації гена *SERPINA1*, що призводить до дефіциту ААТ [21]. Мутаційна точка "Z" Glu342Lys (або заміна лізину глутаміною кислотою в положенні 342 на молекулі ААТ) знаходиться в шарнірній області молекули ААТ, що викликає підвищену тенденцію до полімеризації та агрегації. Окремі особи можуть бути носіями різних мутацій гена ААТ в компаунд гетерозиготному стані.

1.1.5. Характеристика рідкісних моногенних хвороб, пов'язаних із ураженням гепатобіліарної системи

Муковісцидоз – аутосомно-рецесивне захворювання, спричинене мутаціями гена *TRPM*. Основними проявами є хронічний обструктивний процес в дихальних шляхах та порушення травної системи з недостатністю екзокринної функції підшлункової залози. У хворих на муковісцидоз через підвищення в'язкості жовчі спостерігається розвиток холестатичного гепатиту, жовчнокам'яної хвороби, біліарного цирозу печінки [6].

Синдром Криглера – Найяра (ген *UGT1A1*) це сімейна форма вродженої гіпербілірубінемії, при якій окрім жовтяниці спостерігаються важкі порушення центральної нервової системи (ЦНС), дегенерація базальних гангліїв. Частота даного захворювання 1 : 1 000 000. Лікування проводять з

врахуванням типу і ступеня важкості хвороби. При типі I дуже важливим є ранній початок лікування. Етіологічне лікування полягає у вирішенні питання про трансплантацію печінки [123].

Дабіна-Джонса (ген *ABCC2*) [81]- ураження печінки, що проявляється розвитком жовтяниці, пов'язаної з порушенням транспорту прямого (кон'югованого) білірубіну з гепатоцитів у жовч (екскреційна жовтяниця — варіант паренхіматозної жовтяниці) [7]. Жінки хворіють частіше за чоловіків. Тривалість життя не відрізняється від здорових осіб, спеціального лікування не потребує, але при цьому захворюванні строго протипоказаний прийом естрогенів. Захворювання широко поширене серед євреїв – 1 : 1300 [59].

Ротора (гени *SLCO1B1*, *SLCO1B3*) дуже рідкісний доброякісний синдром, при якому спостерігається жовтяниця [110]. Хворіють як жінки, так і чоловіки. Клінічно схожий на синдром Дабіна-Джонсона. Тип успадкування — аутосомно-рецесивний [7]. Причина розвитку — порушення транспортування прямого білірубіну в жовчні капіляри через пошкодження MRP2 каналу [48]. При синдромі Ротора як правило не спостерігають ніяких інших симптомів крім жовтяниці [84].

1.2. Алельні варіанти гена *ATP7B* та їх фенотипові прояви

Перші часткові повідомлення про захворювання датуються 1880-х роками, але перший детальний клініко-патологічний опис було проведено британським неврологом Семюелем Олександром Кін'єром Вільсоном у 1912 році []. У 1913 році німецький лікар Альфред Румпель повідомив про надлишок міді в печінці у пацієнта, який помер від хвороби Вільсона, але накопичення міді було встановлено лише в мозку та на десцеметовій мембрані рогівки. Генетичну природу хвороби Вільсона запропонували шотландський невролог Байром Брамвелл у 1916 р. та Ганс Крістіан Холл у 1921 р. (Який також придумав термін "гепатолентикулярна дегенерація"), але лише в 1960 р. був

підтверджений аутосомно-рецесивний спосіб успадкування. У 1948 році британський невропатолог Джон Натаніель Камінгс на основі демонстрації відкладення міді в мозку та печінці висловив припущення про можливість лікування цього захворювання.

Хвороба Вільсона (Шифр згідно з МКХ-10: E 83.0) (гепатолентикулярна дегенерація) – одне з перших аутосомно-рецесивних моногенних захворювань, для яких розроблено ефективну недорогу терапію [54]. Таких успіхів було досягнуто завдяки детальному дослідженню структури білка, у процесі якого встановлено відповідності між окремими доменами купрум-зв'язуючої АТФази і первинною послідовністю гена *ATP7B*, який її кодує. Ці дослідження дали уявлення про функціонування та роль кожного окремого домену білка у транспорті металу і допомогли знайти шляхи корегування патології. Оскільки купрум входить до складу практично усіх продуктів харчування і є кофактором у багатьох процесах в організмі, цей елемент неможливо виключити із раціону. Для осіб із відсутністю екскреції іонів купруму з клітини неминучим є порушення структури жирних кислот клітинної мембрани. Унаслідок цього втрачається її цілісність, що призводить до дегенерації органів і тканин. Симптомами можуть бути психіатричні (депресія, апатія) та неврологічні розлади (порушення ходи, тремор, дратівливість), ідіопатичний гепатит і цироз, гемолітична анемія, порушення серцево-судинної та опорно-рухової систем [49]. Купрум може роками накопичуватись і не спричиняти виражених симптомів, поки не досягне певного порогового рівня, і тоді за дуже короткий час завдає необоротних змін організму. Для кожного цей пороговий рівень є індивідуальним: наймолодшим пацієнтом, кому підтвердили діагноз, було 3 роки, найстаршому – 80, але в основному симптоми проявляються у віці 30–35 років. Клінічно підтверджено, що ознаки ураження печінки випереджають неврологічні прояви на 10 років. У всіх пацієнтів із неврологічними проявами зафіксовано ураження печінки. Ще одним важливим проявом хвороби є утворення кільця Кайзера-Флейшера [74], зумовлене накопиченням купруму в десцеметовій мембрані рогівки, яке виявляють у 95 %

осіб із неврологічними проявами, але у дітей воно практично відсутнє. Важливим критерієм діагностики є психіатричні та поведінкові зміни, які часто передують печінковим проявам, але пояснюються особливостями пубертатного періоду, а у старших людей нагадують параною та шизофренію. Широкий спектр порушень зумовлений тим, що мідь є кофактором багатьох ферментів організму. Уникнути цих процесів допоможе предиктивне тестування та своєчасне призначення специфічного лікування. Діагностика цього захворювання ускладнена не лише неспецифічністю проявів, а й широким спектром мутацій. Їх описано більше 500, і для 300 встановлено роль у розвитку патології. Тому генетичне тестування мутацій стане можливим лише тоді, коли буде сформовано перелік найчастіших мутацій, характерних для мешканців з хворобою Вільсона з України та складено алгоритм медико-генетичного консультування осіб із високим ризиком розвитку хвороби Вільсона. В Україні таких досліджень на даний час не проведено, тому немає інформації про частоту і спектр мутацій у цього гена для нашої популяції.

1.3. Структура гена *ATP7B* та роль його білкового продукту

Ген *ATP7B* розміщений на довгому плечі хромосоми 13 (13q14,3), складається з 21 екзону, 79461 пар основ та кодує АФТазу Р типу, що зв'язує мідь, АТР7В (В-поліпептид). Середній розмір екзонів 150-300 пар основ, за виключенням другого екзону, розмір якого становить 1233 пар основ. Окремі групи екзонів відповідають за синтез певних доменів білка АТР7В, а саме: 2-6 відповідає за синтез домену, що зв'язує мідь, 6-13 - за синтез шести трансмембранних доменів, 14-18 – за АТФ зв'язуючий домен, 18-21 – за трансмембранні домени (7 і 8). Зміни первинної послідовності ДНК гена *ATP7B* призводять до відповідних функціональних змін білка - від зниження функції (деякі синонімічні заміни) до повної втрати функції (не синонімічні заміни, мутації, що спричиняють зсув рамки зчитування тощо). Наразі виявлено понад

600 патогенних мутацій гена *ATP7B*, і про нові мутації постійно повідомляють у всьому світі.

Довжина поліпептидного ланцюга білка, що кодується геном, становить 1 465 амінокислот, а молекулярна маса — 157 263 кДа [37]. Білок за функціями належить до гідролаз, фосфопротеїнів. Бере участь у таких біологічних процесах, як транспорт іонів міді, альтернативний сплайсинг. Білок має сайт для зв'язування з АТФ, нуклеотидами, іонами міді, магнію та інших металів. Локалізований у цитоплазмі, мембрані, мітохондрії, апараті Гольджі та ендосомах.

Цей білок відповідає за екскрецію іонів Cu^{2+} з клітини, функціонує як мономер і складається з п'яти доменів: домену, що зв'язує мідь, шести трансмембранних доменів [2]. Цьому білку належить роль регулятора внутрішньоклітинного гомеостазу міді. Як тільки рівень міді в гепатоцитах збільшується, запускається система внутрішньоклітинної екскреції через *транс*-Гольджі. У стаціонарному стані АТФаза локалізується в мережі *транс*-Гольджі, але при підвищеній концентрації міді перерозподіляється в везикулярний відсік у цитоплазмі. Зниження концентрації купруму в цитоплазмі сигналізує про повернення АТФази в мережу *транс*-Гольджі та виведення міді у жовч. Доставка іонів Cu^{2+} до білка *ATP7B* відбувається за участю білків-партнерів (*COMMD1*) та шаперонів (*ATOX1*) [9]. Такий механізм дозволяє швидко реагувати на зміну концентрації міді [103], що дуже важливо, так як вона щоденно надходить в організм із продуктами харчування та слугує кофактором ферментів, задіяних у багатьох важливих процесах організму. За нормального функціонування екскреторної системи клітини надлишок міді виводиться в кров, де зв'язується з апоцерулоплазміном та у складі церулоплазміну виводиться через гепатобіліарну систему [6].

Мідь входить до складу практично усіх продуктів харчування, тому організм щоденно отримує в середньому 2-3 мг цього елемента. Мідь задіяна в окисно-відновних процесах, регулює функціонування гормонів гіпофізу, володіє протизапальною та антиоксидантною дією, бере участь у синтезі

колагену, зміцнює судини, тощо. Діє як кофактор таких ферментів як церулоплазмін, цитохром С-оксидаза, дофамін- β -гідроксилаза, супероксиддисмутаза і тирозиназа. Її дефіцит в організмі призводить до порушення функціонування цих ферментів. Так як організм щоденно отримує мідь з продуктами харчування важливим є функціонування системи екскреції іонів Cu^{2+} з клітин, оскільки надлишок цього металу є дуже токсичним і його накопичення призводить до серйозних уражень органів і смерті. В нормі, 85% міді виводиться з організму через гепатобіліарну систему, а екскреція на міжклітинному рівні регулюється АТР7В, який експресується в основному в гепатоцитах і зазвичай локалізується у двох субклітинних точках: у мережі транс-Гольджі та в цитоплазматичних везикулах [103]. У мережі транс-Гольджі АТР7В опосередковує транспортування міді для включення шести атомів міді в апоцерулоплазмін (попередник церулоплазміну) для утворення церулоплазміну. Потім церулоплазмін виділяється в кров. Мідь у складі церулоплазміну є незмінною за фізіологічних умов і становить приблизно 90 % циркулюючої міді. У цитоплазматичних везикулах АТР7В транспортує надлишок міді в передлізосомальні везикули, які потім виводяться в жовч шляхом екзоцитозу через верхівкову канальцеву мембрану гепатоцита.

Порушення транспортування міді призводять до розвитку захворювань, пов'язаних з дефіцитом міді або її надлишком, а саме X-зчепленої хвороби Менкеса, що характеризується прогресуючою нейродегенерацією. Захворювання при відсутності лікування закінчується летально. Зумовлене мутаціями гена *ATP7A*, гомологічного білка до АТР7В, який зменшує транспортування міді по епітелію кишечника (ефективно спричиняючи мальабсорбцію міді) та в інші тканини, що призводить до дефіциту міді. При хворобі Вільсона спостерігається зменшення включення міді в апоцерулоплазмін і транспортування міді з печінки в жовч, що призводить до надлишку міді в тканині, незважаючи на низький рівень циркулюючого церулоплазміну (основна форма циркулюючої міді).

1.3.1. Характеристика мутацій гена *ATP7B* та їх частота в різних популяціях та етнічних групах

Мутації гена *ATP7B* спричиняють дизфункцію білка, що призводить до порушення екскреції іонів міді, та їх накопичення в клітинах. Залежно від локалізації мутації в первинній послідовності гена білок буде мати різні зміни. Наприклад, мутації, які локалізуються з 2 по 6 екзон порушують здатність білка зв'язувати іони металу. Як наслідок, іони міді знаходяться у вільному стані в клітині, не зважаючи на те, що весь наступний ланцюг функціонує. Мутації, які локалізовані з 6 по 13 екзон, зумовлюють порушення функціонування шести трансмембранних доменів, по яких по чергово передаються атоми купруму для виведення з клітини, а мутації в 14–20 екзонах гена викликають дисфункцію АТФ-зв'язуючого домену. Як наслідок, білок втрачає здатність зв'язувати АТФ, який необхідний для здійснення активного транспорту металів з клітини [2]. Таким чином атоми купруму зв'язуються в клітині, але не покидають її. Такі процеси мають незворотні наслідки, та призводять до смерті.

Аналізуючи публікації бази даних PubMed та мутацій Хвороби Вільсона [36] спостерігаємо особливості спектра мутацій гена *ATP7B* серед осіб із хворобою Вільсона у Європі та світі [7, 12]. Узагальнені дані наведено в табл. 1.

Таблиця 1.1

Спектр мутацій гена *ATP7B* у світі та Європі

Країна	Перелік найпоширеніх мутацій			Екзо н	Частота , %
	білок	нуклеотид	RS		
Європа					
Франція	p.Trp779*	c.2336G>A	rs137853283	8	16,0
	p.His1069Gln	c.3207C>A	rs76151636	14	15,0
Угорщина	p.His1069Gln	c.3207C>A	rs76151636	14	42,9
	p.Arg969Gln	c.2906G>A	rs774028495	10	12,0
Швеція	p.His1069Gln	c.3207C>A	rs76151636	14	38,0

Іспанія	p.Met645Arg	c.1934T>G	rs121907998	6	27,0
Туреччина	p.His1069Gln	c.3207C>A	rs76151636	14	17,4
	p.Gly710Ser	c.2128G>A			5,3
	p.Gln457*	c.1369C>T			4,5
Греція	p.His1069Gln	c.3207C>A	rs76151636	14	35,0
	p.Arg969Gln	c.2906G>A	rs774028495	10	12,0
Польща	p.His1069Gln	c.3207C>A	rs76151636	14	72,0
	p.Ala1135fs	c.3400delC	rs137853281	15	7,3
	p.Gln1351* –	c.4051C>T		20	3,7
Латвія	p.His1069Gln	c.3207C>A	rs76151636	14	70,0
	p.Met769fs	c.2298_2299 insC	rs137853283	8	3,7
Австрія	p.His1069Gln	c.3207C>A	rs76151636	14	34,1
	p.Ala1135fs	c.3400delC	rs137853281	15	6,4
	p.Met769fs	c.2298_2299 insC	rs137853283	8	3,6
Німеччина	p.His1069Gln	c.3207C>A	rs76151636	14	52,0
	p.Ala1135fs	c.3400delC	rs137853281	15	6,9
	Інші мут. екзону	8		8	6,5
Західна Росія	p.His1069Gln	c.3207C>A	rs76151636	14	47,8
Англія	p.His1069Gln	c.3207C>A	rs76151636	14	19,0
Азія					
Китай	p.Arg778Leu	c.2332C>T	rs289420748	8	31,0
Тайланд	p.Arg778Leu	c.2332C>T	rs289420748	8	10,5
Африка					
Єгипет	IVS18+6T>C	c.3903+6C>	rs2282057	18	42,0
	p.Ala1140Val	T	-	13	40,6
	p.Lys832Arg	c.3419C>T	rs1061478	10	26,5

		c.2495A>G			
Америка					
США	p.His1069Gln	c.3207C>A	rs76151636	14	40,3
	p.Asn1270Ser	c.3809A>G	rs121907990	18	1,9
	p.Gly1266Arg	c.3796G>A	rs121907992	18	1,9
Бразилія	p.His1069Gln	c.3207C>A	rs76151636	14	37,1
	p.Ala1135fs	c.3400delC	rs137853281	15	31,3
	p.Ala1135GlnfsX	c.3402delC	rs137853281	15	11,4
13					
Коста Ріка	p.Asn1270Ser	c.3809A>G	rs121907990	18	61,0

Аналізуючи дані, наведені в табл. 1. 1, можна зробити висновок про доволі широкий спектр мутацій гена, і високу варіабельність частот у різних популяціях.

Щодо країн Європи, то результати досліджень вказують на переважання мутації (H1069Q), яку виявляють найчастіше серед осіб із діагнозом хворобою Вільсона, але також є свої специфічні мутації. Зокрема, для польської популяції характерний наступний спектр мутацій: у 72 % з 42 обстежених осіб з клінічними чи біохімічними ознаками хвороби Вільсона виявляють мутацію H1069Q (14екзон), у 7,3% - A1135Q (15 екзон), а у 3,7 % – G1351*(20 екзон) [4]. Ці мутації локалізовані в ділянці АТФ-зв'язуючого домену, що викликає порушення активного транспорту міді. Вона зв'язується, але не виводиться з клітини, тому в крові буде високий рівень апоцерулоплазміну – попередника церулоплазміну, і дуже низький, близько 0, рівень церулоплазміну. Це пояснюється тим, що для перетворення апоцерулоплазміну в церулоплазмін білок має зв'язатись з двохвалентною міддю. Низький рівень білка вказує на порушення функціонування екскреторної системи цього елемента [127].

Для пацієнтів Латвійської популяції теж переважаючою мутацією є H1069Q, яку виявляють у 70 % осіб (85 обстежених). Мутацію p.M769fs виявлено у 3,7 % пацієнтів, інші мутації (c.3800A>G (p.Asp1267Gly), c.3971A>C

(p.Asn1324Thr) виявляються у поодиноких сім'ях [30]. Ці мутантні варіанти теж локалізовані в ділянках, що кодують АТФ-зв'язуючий домен.

Для Австрійської популяції серед 16 обстежених причиною захворювання у 34,1 % є мутація H1069Q, у 6,4 % – G710S, 3,6 % – M769fs. Мутації G710S та M769fs локалізовані в ділянці гена, що кодує трансмембранні домени білка (6-13 екзон) [125]. Кожен білок має шість таких доменів. По них передається шість атомів міді до фосфорилуючого домену, де вона проходить крізь мембрану. Мутації цих ділянок спричиняють зміну конформації доменів і вони не можуть передавати зв'язані елементи. Як наслідок купрум накопичується в клітині та спричиняє розпад жирних кислот. Це викликає порушення цілісності мембрани. Такі процеси відобразяться у зміні біохімічних показників крові, що призводить до появи міді в сечі, зменшення рівня церулоплазміну.

Серед жителів Німеччини у 52 % виявляють H1069Q, 6,9 % 3400delC та у 6,5 % причиною захворювання є інші мутації екзона 8 [39]. Мутація 3400delC локалізована у 15 екзоні, що відповідає за синтез АТФ-зв'язуючого домену.

У західній частині Росії серед осіб із ознаками захворювання у 47,8 % осіб причиною є мутація H1069Q [4]. Варто зазначити, що частота цієї мутації знижується серед жителів центральних і східних регіонів. У них формується свій специфічний спектр мутацій, які локалізуються переважно у 8 екзоні.

Дані досліджень сусідніх країн виявили, що мутація H1069Q є переважаючою мутацією, котра спричиняє розвиток хвороби Вільсона. Крім неї існує великий спектр інших мутацій цього гена, для яких підтверджена роль у розвитку захворювання. Детальне дослідження локалізації мутацій та їхній вплив на трансляцію білка дозволяє підібрати специфічну терапію, яка буде найбільш ефективною [104]. Такі знання дають можливість зрозуміти механізм порушення та знайти шляхи його корекції.

Суперечливою є інформація щодо частот здорових гетерозиготних носіїв мутацій гена *ATP7B*, значення якої й визначає поширеність цього генетичного захворювання в популяції. Згідно мета-аналізу генетичних досліджень поширеність ХВ є в 25 разів вищою становить 13,9 : 100 000, або 1 : 7194 [52].

Алельні варіанти гена *ATP7B* мають різні частоти в популяціях та етнічних групах. Не має даних про частоту та спектр мутацій гена *ATP7B* серед пацієнтів з України. Це має стати основою алгоритму для впровадження в практику медико-генетичного консультування.

Зважаючи на наявність ефективного лікування, але відсутність вчасної діагностики через мультисистемність проявів, дуже важливо щоб генетична діагностика цього захворювання була швидкою та економічно доступною. Зробити це можна шляхом впровадження генетичного тестування найпоширеніших патогенних варіантів гена *ATP7B* в конкретному регіоні.

Поширеність хвороби Вільсона приблизно однакова у більшості країн, і перебуває в межах 1:30 000 – 1 : 200 000 жителів [86]. Частота гетерозиготного носійства 1: 90 [44]. Найвища частота захворювання в Німеччині 1: 40000 жителів, Японії 1: 30 000 жителів [4] та Австрії 1 : 30000 [138]. Країна з найвищою захворюваністю в світі – Коста-Ріка 1: 20 000, що може бути пов'язано з підвищеним рівнем споріднених шлюбів. Проте в певних країнах хвороба зустрічається набагато рідше. Дискутабельним залишається питання частоти хвороби Вільсона в світі, й в Україні, зокрема. Опубліковані в літературі дані щодо розповсюдження цього захворювання ґрунтувалися, зазвичай, на даних клінічно діагностованих випадків.

Хоча спочатку були описані неврологічні прояви захворювання [28] симптоми можуть бути плеоморфними. Не описано прямої кореляції мутацій з типом захворювання [102, 65]. Прояви хвороби Вільсона можуть бути переважно печінковими, неврологічними або психіатричними, а важкість симптомів можуть варіювати від безсимптомного стану до гострої печінкової недостатності [68]. Неврологічні прояви можна класифікувати як: акінетичний синдром, подібно до хвороби Паркінсона; псевдосклероз (переважає тремор); атаксія; дистонічний синдром, який часто призводить до сильних контрактур [142]. Печінкові форми можуть бути безсимптомними з підвищенням трансаміназ, або проявляться гострим гепатитом, цирозом та печінковою недостатністю.

Печінка є початковим місцем патологічного накопичення міді при хворобі Вільсона [44]. Порушення з боку печінки включають стеатоз, гострий і хронічний гепатит, гостру печінкову недостатність із супутньою Кумбс-негативною гемолітичною анемією, та цироз. На момент діагностики хвороби Вільсона у всіх пацієнтів виявляється певний ступінь ураження печінки [52]. Симптоми, дані лабораторних обстежень у пацієнтів із печінковою формою хвороби Вільсона змінюються залежно від ступеня ураження печінки [38]. Основними ознаками печінкової форми хвороби є: кільця Кайзера-Флейшера, помітні у 50 % пацієнтів і спостерігаються при всіх формах ураження печінки, стеатоз, хронічний гепатит, компенсований цироз, біль у животі (гострий гепатит, гостра печінкова недостатність), жовтяниця (гострий гепатит, гостра печінкова недостатність, цироз), гепатомегалія (гострий та хронічний гепатит, гостра печінкова недостатність), спленомегалія (цироз), асцит (цироз), верхні шлунково-кишкові кровотечі (цироз з варикозом або портальна гіпертензивна гастропатія), периферичні стигмати хронічних захворювань печінки (цироз), зміни психічного стану внаслідок печінкової енцефалопатії (гостра печінкова недостатність, цироз) [85].

Описано широкий спектр неврологічних проявів хвороби Вільсона, що значно ускладнює вчасну коректну діагностику. Більше 90 % пацієнтів із хворобою Вільсона з неврологічними проявами мають кільця Кайзера-Флейшера на десцеметовій мембрані рогівки. Неврологічні симптоми можуть бути стертими, або сильно вираженими та швидко прогресувати, що призводить до втрати працездатності [106]. Деякі з найбільш поширених неврологічних симптомів можуть бути: дизартрія (85 - 97% пацієнтів з неврологічною хворобою Вільсона), порушення ходи / атаксія (30 – 75%), дистонія (11 – 69%), тремор (22 - 55%), паркінсонізм (19 – 62%) [86].

Інші неврологічні прояви включають: *Risus sardonicus* (сардонічний вираз, спричинений дистонічним спазмом м'язів обличчя), хорею, атетоз, когнітивні порушення / недоумство, судоми, гіперрефлексію, міоклонію, нетримання сечі, автономну дисфункція.

Поведінкові та психіатричні симптоми частіше зустрічаються у пацієнтів з неврологічним ураженням, ніж в осіб із ураженням печінки [96]. Однак психіатричні симптоми можуть передувати печінковим або неврологічним проявам хвороби. Найбільш поширені поведінкові та психіатричні симптоми включають депресію (20-30% пацієнтів із хворобою Вільсона), зміну особистості, агресивну поведінку та дратівливість [28]. Однак поведінкові та психіатричні симптоми спричинені хворобою Вільсона часто неправильно інтерпретуються (наприклад, їх можна віднести до пубертатного періоду, параної чи шизофренії). Тому при поведінкових та психіатричних проявах хворобу Вільсона діагностують досить пізно.

Поведінковими та психіатричними проявами хвороби є депресія, зниження успішності в школі, незначні зміни особистості, дратівливість, імпульсивність, лабільний настрій, сексуальний ексгібіціонізм, невідповідна поведінка, дистимія, біполярний розлад, психоз.

Інші прояви хвороби Вільсона, які є менш поширеними, включають: синдром Фанконі, при якому проксимальна каналцева дисфункція призводить до глюкозурії, аміноацидурії, гіпурикемії та проксимального каналцевого ацидозу нирок, артропатії з особливостями передчасного артрити та зрідка хондрокальцинозу, найчастіше в коліні, гігантизм, кардіоміопатія, міопатія, гіпопаратиреоз, панкреатит, імпотенція, безпліддя або повторні спонтанні аборти, різноманітні дерматологічні розлади [118].

Механізми виведення міді у новонароджених недостатньо розвинені і починають краще функціонувати протягом першого року життя. У пацієнтів із хворобою Вільсона шлях виведення міді з клітин не працює, або є дефектним, а накопичення міді починається з народження і триває протягом усього життя, поступово спричиняючи клінічні прояви [97]. Більшості пацієнтів із хворобою Вільсона ставлять діагноз у віці від 5 до 35 років (середній вік 13 років) [28], хоча є випадки, коли захворювання було діагностовано у молодших пацієнтів та у пацієнтів старше 70-ти років [8]. У дослідженні Wiernicka A та співавтори описують обстеження 143 дітей із хворобою Вільсона, серед яких 21 дитина (15

відсотків) мала симптоми або зміни в показниках діагностичних тестів у віці до 5-ти років. 85% дітей не мали жодних змін у біохімічних аналізах. Серед дітей найчастіше спочатку розвиваються печінкові порушення у середньому віці від 9 до 13 років [82], при цьому хвороба Вільсона становить 8–10 % хронічного активного гепатиту у дітей [111]. Хвороба, діагностовані за допомогою сімейного скринінгу через випадки захворювання в сім'ї, часто протікає безсимптомно. В інших пацієнтів до підліткового віку захворювання печінки можуть прогресувати безсимптомно, аж до розвитку цирозу або гострої печінкової недостатності. У деяких випадках неврологічні або психіатричні прояви можуть передувати печінковим симптомам.

На відміну від дітей, у яких частіше спостерігаються печінкові прояви, для пацієнтів старшого віку більш характерними є неврологічні ознаки. Середній вік маніфестації для пацієнтів з неврологічними симптомами коливається між 15 та 21 роком [70], але частіше списуються на пубертатний період та поведінкові зміни.

Різниця у віці початку маніфестації хвороби Вільсона, ймовірно може залежати від типу мутацій, пенетрантності, екстрагенних факторів та впливі навколишнього середовища, включаючи дієту, спосіб життя, місце проживання тощо.

Діагностика хвороби Вільсона починається з розпізнавання клінічних симптомів, що свідчать про захворювання або наявність обтяженого генетичного анамнезу. Дослідження починають з серологічного тестування (біохімічні дослідження печінки, загальний аналіз крові та рівень церулоплазмину в сироватці крові), дослідження очної щілинної лампи та визначення рівня добової секреції міді в сечі. У віці від 5 до 35 років лише приблизно у половини пацієнтів з кінцевим діагнозом хвороба Вільсона є класична клінічна картина захворювання [127], тобто у більше половини пацієнтів без прямої діагностики встановити діагноз так і не вдається, оскільки сукупність діагностичних тестів не дають однозначної відповіді.

Результати лабораторних досліджень можуть включати: низький рівень церулоплазміну в сироватці крові (спостерігається при всіх формах ураження печінки, хоча і не настільки сильно відповідає гострій печінковій недостатності), підвищені амінотрансферази (всі форми ураження печінки), тромбоцитопенія (цироз із спленомегалією), коагулопатія (цироз або гостра печінкова недостатність), Кумбс-негативна гемолітична анемія (часто спостерігається в поєднанні з гострою печінковою недостатністю, але може протікати як епізодичний гемоліз без печінкової недостатності).

Під час ультразвукового обстеження може виявлятися стеатоз печінки (хронічний гепатит), маленька вузлова печінка (цироз), спленомегалія (цироз).

Зміна рівнів трансаміназ можуть спостерігатися при вірусних гепатитах, зловживанні алкоголем, аутоімунним гепатитом, гепатотоксичністю через ліків або добавок, спадковому гемохроматозі та дефіциті альфа-1 антитрипсину. У пацієнтів із хворобою Вільсона амінотрансферази зазвичай незначно-помірно підвищені, а концентрація аспартатамінотрансферази (АСТ) зазвичай вища, ніж концентрація аланін-амінотрансферази (АЛТ) [38].

Гостра печінкова недостатність може бути викликана вірусним гепатитом, токсинами, алкоголем, ішемією, спадковими метаболічними захворюваннями та аутоімунним гепатитом. Серед пацієнтів з гострою печінковою недостатністю спричиненою хворобою Вільсона амінотрансферази в сироватці крові, як правило, менше 2000, при співвідношенні $AST / ALT > 2$ [144]. Крім того, рівень лужної фосфатази зазвичай є нормальним або субнормальним, з співвідношенням лужної фосфатази (міжнародна одиниця / л) до загального білірубіну (мг / мл) співвідношення < 4 . Також у пацієнтів з гострою печінковою недостатністю через хворобу Вільсона зазвичай спостерігається Кумбс-негативна гемолітична анемія і може бути низький рівень сечової кислоти. Звичайні діагностичні параметри ХВ (церулоплазмін, мідь сироватки крові чи мідь у сечі) є менш чутливими та специфічними. Церулоплазмін зазвичай знижується у пацієнтів з неврологічними проявами захворювання, але може бути в межах норми у половини хворих з активним

перебігом. Це пояснюється тим, що дуже багато зовнішніх та фізіологічних чинників впливає на рівень цього білка в організмі[8]. Діагноз може бути підтверджений біопсією печінки, якщо це можливо, або, принаймні, дослідженням органу після трансплантації (вміст міді в паренхімі печінки, аналіз мутацій). При неможливості проведення біопсії печінки через потенційні ускладнення вдаються до радіоізотопного дослідження поглинання печінкою радіоактивної міді — тест включення ізотопу міді (^{64}Cu або ^{67}Cu) у церулоплазмін. Кінетика радіоактивної міді дозволяє виявляти не тільки хворих на WD, але й гетерозиготних носіїв, а також диференціювати WD від гепатоцеребрального синдрому при інших захворюваннях печінки

Зважаючи на неоднозначність та не специфічність тестів на 8 міжнародному з'їзді присвяченому хворобі Вільсона (8th International Meeting on Wilson's disease, Leipzig 2001) було розроблено бальну систему біохімічних та генетичних тестів, на основі яких може бути підтверджено діагноз. Показано, що лише зі застосування генетичної діагностики можна однозначно підтвердити діагноз (4 бали). Звичайно, діагноз може бути встановлений і без тестування на наявність мутацій, якщо відповідно до бальної системи пацієнт набере 4 бали, або діагноз буде підтверджено після біопсії печінки [117].

Усі згадані тести не є специфічними та дозволяють встановити сам факт ушкодження печінки, а не причину такого стану. Проведення рекомендується у пацієнтів з гострими проявами, і ніхто не проводить діагностику у дітей до появи серйозних наслідків (гостра або хронічна хвороба печінки, автоімунний гепатит), а вони уже народжуються з цим захворюванням і з моменту початку їх харчування вони отримують мідь, яка не виводиться. І нехай симптоми проявляються згодом накопичення міді в органах починається з моменту народження. В такому випадку жодні біохімічні тести не є інформативними. Лише генетична діагностика може однозначно підтвердити діагноз ще до розвитку симптомів.

У зв'язку з тим, що мідь є кофактором багатьох ферментів та через присутність індивідуальної диференційної активності спостерігається значна

гетерогенність клінічних проявів, в тому числі у осіб з однаковими мутаціями. Цей факт значно ускладнює клінічну діагностику. Дуже складно диференціювати симптоми неврологічного захворювання від неврологічних проявів Хвороби Вільсона, оскільки хворі дуже часто мають більше ніж одне порушення, кожне з яких має прояв різної важкості. Не можна забувати про психіатричні порушення, які дуже часто затримують діагностику, оскільки списуються на поведінкові проблеми підлітків, а у старших людей маскується як шизофренія чи параноя. У літературі описано випадок, коли від появи симптомів до поставленого діагнозу пройшло 12 років.

Повідомлення про випадки ХВ з України є обмежені описом поодиноких клінічних випадків як знахідок [134, 133, 137]. І. Гапонов дає ґрунтовний опис результатів тривалого спостереження за групою пацієнтів з ХВ [142], переважно з неврологічними проявами. Проте за даними окремих досліджень у стаціонарах гастроентерологічного профілю частка ХВ серед пацієнтів із хронічним ураженням печінки може досягати 7 % [144]. Незважаючи на те, що перші симптоми з'являються у дитинстві або в ранній юності, діагностувати хворобу Вільсона на ранніх етапах є важко. Окрім генетичної діагностики немає тесту для діагностування досимптомних випадків хвороби Вільсона. В Україні немає єдиного реєстру випадків ХВ, немає опублікованих даних про очікувану частоту гетерозиготних носіїв хвороби, що потребує окремого дослідження.

Нелікована хвороба Вільсона є летальною [1]. Накопичення міді в печінці врешті-решт призводить до розвитку цирозу. Серед пацієнтів з неврологічними порушеннями захворювання може сильно прогресувати, призведе до інвалідизації, втрати працездатності та смерті. Прогресування, як правило, відбувається поступово, але може статися раптове погіршення. Більшість пацієнтів помирає від захворювань печінки (цироз або гостра печінкова недостатність), інші помирають через ускладнення через прогресуюче неврологічне захворювання.

Немає даних щодо тривалості життя серед нелікованих пацієнтів із хворобою Вільсона. Одне дослідження виявило, що в середньому після розвитку неврологічних симптомів тривалість життя становила приблизно п'ять років [50]. Серед пацієнтів, у яких розвинулася гостра печінкова недостатність через хворобу Вільсона та за відсутності трансплантації печінки рівень гострої смертності становить щонайменше 95 %.

Прогноз для пацієнтів, які отримують специфічне для хвороби Вільсона лікування відмінний, навіть у тих, хто вже має зафіксовані зміни в печінці [57]. Після лікування у пацієнтів спостерігається зникнення усіх симптомів, в тому числі неврологічних, та повернення працездатності.

Серед пацієнтів, які потребують трансплантації печінки, через запущену форму хвороби Вільсона більше року живе 79-90% пацієнтів [68]. Результати Об'єднаної Організації Наукового реєстру трансплантації в США встановили, що серед дорослих людей, пересадку яким робили між 1987 і 2008 роками ($n = 400$) було 88% тих, хто пережив перший рік та 86% тих, хто пережив п'ятий рік після трансплантації. Для дітей у 2002 та 2008 роках ($n = 170$) ці показники становили 90 та 89% відповідно [126]. Дані результати вказують на високий відсоток виживання пацієнтів з хворобою Вільсона після трансплантації, однак варто згадати, що пацієнтам, у яких окрім печінкових порушень є також серйозні неврологічні не рекомендується пересадку органу, оскільки дана операція не буде ефективною.

Пуєчова Е. та співавтори описують клінічний випадок ранньої маніфестації хвороби Паркінсона у пацієнта, з мутацією Cys1079Gly гена *ATP7B* в гетерозиготному стані. Також у нього зафіксували зниження церулоплазміну з 0.33 до 0.27 г\л, що характерно для проявів хвороби Вільсона. Зважаючи на аутосомно-рецесивний тип успадкування та відсутність інших перебудов в межах гена вчені припустили ймовірну роль гетерозиготного носійства мутацій гена *ATP7B* при хворобі Паркенсона. [27]. Також є дані, які пов'язують певні поліморфізми гена *ATP7B* з розвитком хвороби Альцгеймера.

Оскільки захворювання характеризується високою смертністю (95%) без термінової трансплантації печінки, але для якого є розроблена недорога ефективна терапія дуже важливо зосередитись на діагностиці даної нозології, щоб попередити важкі ураження печінки та інших органів. Крім того, діагностика має бути вчасною, поки накопичення ще не спричинило стрімкої деградації органів. Зважаючи на широкий спектр проявів однозначно підтвердити діагноз може лише генетична діагностика.

Таким чином, питання частоти хвороби Вільсона в світі, й в Україні, зокрема є залишається дискусійним й потребує окремого дослідження. Суперечливою є інформація про частоту здорових гетерозиготних носіїв мутацій гена *ATP7B*, значення якої й визначає частоту цього генетичного захворювання в популяції. Тому, доцільним є дослідження поширеності мутацій гена *ATP7B* в загальній вибірці, осіб з гепатобіліарними порушеннями нез'ясованого генезу та при наявності клінічних проявів характерних для хвороби Вільсона. Потребують опрацювання критерії диференційної діагностики хвороби Вільсона з іншими спадковими хворобами, які проявляються гепатобіліарними порушеннями в осіб молодого віку. Сюди належать спадкові мутації гена *HFE* та гена *UGT1A1*, які клінічно проявляються як спадковий гемохроматоз та синдром Жильбера, відповідно. Актуальним питанням є розробка та широке впровадження доступного генетичного дослідження мутацій гена мідь зв'язуючої АТФази Р- типу (*ATP7B*), які зумовлюють порушення гепатоцелюлярного метаболізму міді. В Україні немає єдиного реєстру випадків ХВ, немає опублікованих даних про очікувану частоту гетерозиготних носіїв хвороби. Різні алельні варіанти гена *ATP7B* мають відмінні частота в окремих популяціях та етнічних групах. Не має даних про частоту та спектр мутацій в гені *ATP7B* серед пацієнтів з України, яка має стати основою алгоритму для впровадження в практику медико-генетичного консультування.

Результати даного розділу опубліковано в наступній статті:

Гайбонюк І. Спектр і частота мутацій гена *ATP7B* в різних популяціях та етнічних групах. *Вісник Львівського національного університету ім. І. Франка*. 2019. № 80. С. 3-12.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріали дослідження

2.1.1. Характеристика осіб обстежених груп

Матеріалом для молекулярно-генетичних досліджень були зразки ДНК, отримані з ядерних клітин венозної крові пацієнтів із гепатобіліарними порушеннями нез'ясованого генезу та осіб контрольної групи. Зразки для досліджень були взяті у пацієнтів після отримання від них інформаційної згоди. Більшість обстежуваних осіб контрольної та дослідних груп були мешканцями західних областей України: м. Львів, Львівської, Івано-Франківської, Тернопільської, Волинської, Закарпатської, Рівненської та Чернівецької областей України. У дослідження також були включені особи, що проживають у Дніпропетровській, Запорізькій, Донецькій та Харківській областях.

До групи пацієнтів із гепатобіліарними порушеннями нез'ясованого генезу, а також із неврологічними проявами хвороби Вільсона увійшло 172 осіб віком від 3 до 70 років (середній вік становить $21,8 \pm 7,4$) у яких хвороба була підтверджена клінічно та лабораторно. Усі пацієнтами дослідної групи не мали вірусних гепатитів, алкогольного цирозу, медикаментозного ушкодження печінки. Пацієнтів із неврологічними проявами було відібрано шляхом аналізу родоводів та виключення осіб з проявами захворювань в кожному поколінні, що не підтверджує автосомно-рецесивного типу успадкування. Групи особи з гепатобіліарними порушеннями нез'ясованого генезу відбирались шляхом скерування лікарями пацієнтів з інфекційних відділень Львівської обласної клінічної лікарні, гастроентерологічному центрі м. Дніпро. Особи з ознаками захворювання хвороби Вільсона скеровувались також з неврологічних відділень Львівської обласної клінічної лікарні та 10 областей України: Львівської, Івано-Франківської, Тернопільської, Волинської, Закарпатської, Рівненської, Чернівецької, Хмельницької, Донецької, Дніпропетровської

областей. Обстеження пацієнтів проводили за схемами індивідуальної карти клінічного огляду. Усім пацієнтам проводились обстеження, які включали збір генеалогічного анамнезу, клінічний огляд, опис біохімічних показників крові та даних МРТ головного мозку, та молекулярно–генетичні дослідження. Разом із лікарями проведено аналіз реєстраційних карт, які включають інформацію про вік, стать, місце праці і проживання, наявність шкідливих звичок та дані лабораторних обстежень (біохімічні показники крові та сечі, дані магнітно-резонансної томографії (МРТ) головного мозку пацієнтів).

Лабораторні обстеження були проведені у всіх 172 осіб в повному обсязі, індивідуалізовані, залежно від особливостей клінічних проявів у конкретної особи. Зокрема, брались до уваги основні діагностичні критерії: ураження печінки без вірусного гепатиту, високий рівень міді в добовій сечі, низький рівень церулоплазміну, високий рівень міді сироватки крові, показники рівнів АЛТ, АСТ, лужної фосфатази, загального білірубіну, рівень трансферину, феритину, Кумбс-негативна гемолітична анемія, фіброз печінки різного ступеню, присутність\відсутність кільця Кайзера-Флейшера на десцеметовій мембрані рогівки, поява неврологічних (тремор, порушення мови, ходи, почерку, паркинсонізм) та психіатричних проявів: шизофренія, депресія, апатія тощо.

Для формування груп пацієнтів проводився детальний збір анамнезу, на основі співпраці з лікарями оцінювалася клінічна картина перебігу захворювання.

Критерії оцінювання пацієнтів високого ризику розвитку хвороби Вільсона наведено в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Бальна система біохімічних та генетичних тестів для діагностики ХВ

Критерій	Бали	Критерій	Бали
Кільце Кайзера-Флейшера		Мідь в печінці (за відсутності холестазу)	
Присутнє	2	>5x вище норми	2
Відсутнє	0	0,8-4 мкмоль/г	1
		Норма (<0,8 мкмоль/г)	-1
		Роданін-позитивні гранули	1
Неврологічні прояви		Мідь в сечі (за відсутності гострого гепатиту)	
Сильно виражені	2	Норма	0
Середній прояв	1	1-2x вище норми	1
Відсутні	0	>2x вище норми	2
		Норма, але після терапії D-пеніциллінами в 5 разів вище норми	2
Рівень церулоплазміну сироватки крові		Генетичне тестування мутацій	
Норма (>0,2 г/л)	0	Виявлено дві мутації	4
0,1-0,2 г/л	1	Виявлено одну мутацію	1
<0,1 г/л	2	Не виявлено мутацій	0
Кумбс-негативна гемолітична анемія			
Присутня	1		
Відсутня	0		
Сумарна кількість балів	Інтерпретація		

4 чи більше	Діагноз підтверджено
3	Можливо Хвороба Вільсона. Потрібно провести додаткові дослідження
2 і менше	Мало ймовірно, що це хвороба Вільсона

Для виконання дослідження було сформована контрольна група чисельністю 800 осіб. До неї входили здорові чоловіки та жінки віком від 25 до 35 років без ускладненого генетичного анамнезу. Всі обстежувані індивіди контрольної групи є вихідцями з території західних областей України: Львівської, Івано-Франківської, Тернопільської, Хмельницької, Волинської, Закарпатської, Рівненської та Чернівецької.

2.1.3. Реагенти та робочі розчини.

Для проведення молекулярно-генетичних досліджень матеріалом для дослідження були зразки ДНК, виділені з лейкоцитів периферійної крові з використанням наступних реагентів: протеїназа К, додецилсульфат натрію, ЕДТА (етилендіамінтераацетат натрію), хлорид натрію, TRIS (гідроксиметилметиленамін). Метод гетеродуплексного аналізу проводили з використанням наступних реактивів: акриламід, бісакриламід, бромистий етидій, ксиленціанол виробництва фірми "SIGMA", 10х кратний ксиленціаноловий реакційний буфер виробництва "ThermoFisher Scientific", агароза виробництва „Amresco” (США). Для дослідження методом PCR Bi-PASA використовували наступні реагенти: 2X PCR Master Mix виробництва „ThermoFisher Scientific”, суміш dNTP (дезоксинуклеотидтрифосфати) виробництва „ThermoFisher Scientific, олігонуклеотидні праймери, термостабільна Taq-полімераза виробництва “ThermoFisher Scientific” та ендонуклеази рестрикції: MwoI, DdeI, RsaI, Bcl I виробництва “ThermoFisher Scientific”.

Олігонуклеотидні праймери для полімеразної ланцюгової реакції, що були використані в роботі, синтезовані фірмою „ThermoFisher Scientific” згідно опублікованих послідовностей, та підібраних самостійно за допомогою програми Primer design3. Для перевірки та дизайну послідовностей олігонуклеотидних праймерів для полімеразної ланцюгової реакції користувалися базою даних NCBI з використанням пошукової системи <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>, PCR in silico та on line ресурсом Restriction maps. Встановлення первинної послідовності ДНК проводили методом прямого секвенування за Сенгером. Первинна послідовність олігонуклеотидних праймерів, які використовувались для проведення ампліфікації *in vitro* за допомогою ПЛР наведено у таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

Послідовності олігонуклеотидних праймерів, використаних для ампліфікації фланментів ДНК з використанням методу ПЛР

Ген	Локус	Послідовність 5` - 3`	Температура відпалу
<i>HFE</i>	H63D	F: tggcaagggtaaacagatcc F: ctcaggcactcctcctcaacc	50
	C282Y	F: acatggttaaggcctgttgc F:gccacatctggcttgaatt	50
<i>ATP7B</i>	H1069Q	F: gggccctctaagtggtttc R:cccctccatctgtattgtgg	65
	2304dupC	F: gtcacgactgtgcacaaagc R: tctgaacctgaagctgctgt	55
<i>UGT1A1</i>	A(TA) ₇ TAA)	F: tgt tgc atg aga aaacgc ca R: gtc gcc tgt tca cca agg at	55

Послідовності праймерів, які використовувались для встановлення первинної послідовності ДНК, наведено в таблиці 2.3.

Таблиця 2.3

Послідовності олігонуклеотидних праймерів, використаних для встановлення первинної послідовності ДНК за методом Сенгера

Ген <i>ATP7B</i>					
Екзон	Праймери	Екзони	Праймери	Екзон	Праймери
1	F: cttaacacccccgctctcct R: aaaatcctcctgggtgggag t	6	F: aaagtgctttctgccaatg c R:agagtgggccaggt agag	14	F: gggccctctaagtggttt c R:ccctccatctgtattg tgg
2.1	F: tccattttctcagtgccaga R:cccattgcccccaattg t	7	F: cagaaggggagtggttg ta R:acacagcatggaagg gagag	15	F: tttcacttccccctcttgg R:ctgtggtttgaccac ctct
2.2	F: atatgtgcatcggttggt R:tctcttgggttagtgctt tg	8	F: gtcacgactgtgcacaaa gc R: ttctgaacctgaagctgct gt	16	F: gctgttaaaaggattgcat gg R:tctgagagagcggaa ggaag
2.3	F: ctgcatcaagagcaaagt g R:tgatctgtcccactcct tc	9	F: gtgactctcaggctgggtt t R:tcttgcacactcac aag	17	F: cccaactgtgtagctgct g R: ggccaactgggtgcttactt t

2.4	F: ggagaacaaaactgccca ag R:ctcaggacatgcctcaa aca	10	F: cagctggcctagaacctg ac R:cctcctgagggaaacat gaaa	18	F: gggcaagggttaactga ggt R:tgatggagaggagca cacag
3	F: ctcaccaagagccctgaaa c R:cgcagcattcctaagtt caa	11	F: tgacagttgtctctttcctac gtc R:tcccagaactcttcaca taatttc	19	F: ctgtgtgctcctctccatc a R:tactaaccaccagcag gaac
4	F: ctgcccaccagagtgta c R:ggatgtgtccaaaatgc aaa	12	F: atttccatggctcttggtgt R:aaccaccatatagccc aagg	20	F: cctaggtgtgagtgcgag ttc R:tgggaaatgagaggc aagtt
5	F: tttcttgatcctgggtctg R:gctatattttctcattttct tactg	13	F: cctgcctctgactctgtcct R:catctctcaggatggg gaaa	21	F: agatgctgttgcttctctg R:tcagcttgggtgagt ggag

У процесі роботи використовувались розчини, для приготування яких застосовували реагентів вітчизняного виробництва ОСЧ та ЧДА (Україна):

ретикуючий розчин – 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 7 мМ MgCl₂ x 6H₂O;

буфер ТБЕ – 0,09 М трис-НСl, 0,09М борна кислота, 2 мМ ЕДТА;

розчин 20xSSC (рН 7,0) – 3М NaCl; 0,3М цитрат Na;

Буфер 10xТБЕ – 0,89М трис-НСl; 0,89М борна к-та; 20мМ ЕДТА;

STE-розчин: 100 мМ NaCl, 50 мМ трис-НСl (рН 7,4), 1 мМ ЕДТА;

ТЕ розчин: 10 мМ трис-НСl (рН 7,5), 1 мМ ЕДТА);

Лізуючий розчин: 131 мМ NH₄Cl, 0,9 мМ NH₄HCO₃;

2.2. Методи дослідження

У роботі використовували наступні методи: аналіз генеалогічної інформації, лабораторні (ДНК-діагностика), статистична аналіз отриманих результатів.

2.2.1. Молекулярно-генетичні методи дослідження

Виділення та очищення ДНК із ядерних клітин крові проводили методом висолювання [132]. У якості антикоагулянта використовували 300 мкл 1М ЕДТА.

Виділення та очищення ДНК. Виділення ДНК із ядерних клітин крові методом висолювання

Проводили забір 3-5 мл периферійної крові у вакутейнери. У якості антикоагулянта використовували 300 мкл 1М ЕДТА. Промивали клітини крові 2-3 рази рівним об'ємом однократного ретикулюючого розчину. Розчин перемішували 10 хв. та центрифугували при 2,5 тис. об./хв. протягом 10 хв., надосадову рідину відкидали. Перемішували осад 5-10 хв. із лізуючим розчином приготованим *extempore*, центрифугували та відбирали надосадову рідину. Даний етап повторювали двічі. Ресуспендували осад в 3-5 мл. розчину STE, додавали 100-200 мкл 10% розчину SDS та 30-50 мкл. протеїнази К (10мкг/мл) та інкубували при 37°C протягом ночі. До суміші додавали 1,5мл 6М NaCl. Перемішували суміш 10 хв. та центрифугували 15 хв. при 4000 об./хв. Надосадову рідину переносили у скляну пробірку, додавали 2,5 об'єму охолодженого 97% етанолу. У пробірці утворювався осад ДНК.

ДНК відбирали за допомогою мікропіпетки. Промивали ДНК охолодженим розчином 70% етанолу, центрифугували при 10000-11000 об./хв., надосадову рідину зливали. Осад підсушували до повного зникнення запаху спирту. ДНК розчиняли у 200–500 мл розчину TE та зберігали при $t=4^{\circ}\text{C}$.

Вимірювання концентрації ДНК

Визначення концентрації ДНК проводили з використанням спектрофотометра DeNovix.

Ампліфікація фрагментів ДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.

Ампліфікацію послідовностей ДНК проводили, використовуючи метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). ПЛР проводили в автоматичному режимі на термоциклерах „Терцик” („ДНК-технология”, Росія), “Perkin Elmer” 4800, 2400 (“Cetus”, США).

Специфічність ПЛР – продуктів визначали послідовністю специфічних праймерів, температурою відпалу та складом реакційного буферу. Реакцію проводили при загальних об’ємах суміші від 8 до 25 мкл.

Оптимальну концентрацію катіонів Mg^{2+} у реакції та температуру відпалу підбирали емпірично для кожної пари праймерів. Для позбавлення від синтезу неспецифічних продуктів, застосовували методику “*hot start*”: ДНК денатурували при температурі 95°C протягом 5-8 хвилин та додавали 1-2 одиниці активності термостабільної ДНК полімерази.

Для приготування суміші для ПЛР, відповідно до кількості реакцій, вносили в пробірку типу епандорф наступні компоненти у вказаному порядку: деіонізовану воду, 10x кратний реакційний буфер з 50 мМ MCl_2 , суміш DNTP - по 2,5 мМ кожного, олігонуклеотидні праймери – по 10 пМ/мкл кожного, 0,3 – 1 одиницю активності термостабільної ДНК-полімерази. Добре перемішували, розаліквотили відповідно до кількості реакцій, додавали одну краплю мінерального масла та 1 мкл розчину ДНК матриці (0,1–0,5 мкг). Пробірки поміщали в ампліфікатор і у відповідності до послідовностей, що ампліфікуються та за типом ПЛР використовували різні температурно-часові параметри. Якщо зразки не підлягали аналізу відразу після закінчення ПЛР, то

їх зберігали при +4° С. Для детекції мутацій Н63D та С282У гена *HFE* оптимізовано наступні температуро-часові параметри, які наведено в таблиці 2.4.

Таблиця 2.4

Температуро-часові показники та кількість циклів ампліфікації фрагментів, що охоплюють мутації Н63D та С282У гена *HFE*.

<i>Ген, SNP</i>	<i>Температура – часові показники</i>
<i>HFE</i>	1 цикл: 1хв.- 96°С
Н63D	10 циклів: 15 сек. - 96°С, 50 сек. – 65,5°С, 40 сек. - 72°С,
С282У	20 циклів: 10 сек. - 96 °С, 50 сек. - 60°С, 40 сек. - 72°С
	1 цикл: 5 хв. - 72°С

Ампліфікація геномних послідовностей за допомогою двонаправленої ампліфікації специфічних алелей ПЛР BI-PASA (Bi-directional PCR allele-specific amplification)

Для проведення ампліфікації у двох напрямках використовуються дві пари праймерів (внутрішні та зовнішні). З внутрішньої пари праймер А є комплементарним до точкової мутації на кодуючій нитці, а праймер В є комплементарним дикому типу (нормі). Зовнішня пара праймерів Р і Q, охоплює послідовність upstream та downstream від місця перебудови на кодуючих і некодуючих нитках відповідно. Р і Q вибираються так, щоб амплікони РВ і АQ мали характерні довжини, які можна фракціонувати методом форефу. На електрофореграмі у всіх зразків будуть детектувати фрагменти РQ (зовнішня пара праймерів); гетерозиготи і гомозиготи за диким типом матимуть фрагмент РВ, а гетерозиготи і мутантні гомозиготи матимуть фрагмент АQ. Внутрішні праймери А і В високоспецифічні лише до одної послідовності в ДНК і вони мають багаті на GC хвости. На ефективність реплікації впливає передача матриці: у ході ампліфікації зовнішні праймери зменшують геномну ДНК до амплікона, який у PCR BI-PASA є матрицею для

внутрішніх праймерів А та В. Це сприяє само підсиленню, яке відбувається, коли короткі фразменти копіюють лише себе, а не отримують фрагмент з геномної ДНК. Самопідсилюванню також сприяють хвости, багаті на GC, та умови відпалу, які відкидають усі, окрім міцніших G-C зв'язків.

Для детекції мутації Н1069Q гена *ATP7B* оптимізовано наступні температуро-часові параметри, які наведено в таблиці 2.5.

Таблиця 2. 5

Температуро-часові показники та кількість циклів ампліфікації фрагментів, що містять мутацію Н1069Q гена *ATP7B*

Ген, SNP	Температура – часові показники
<i>ATP7B</i>	1 цикл: 15хв - 96°C
с. 3207A>C	30 циклів: 0,5хв. – 94°C; 0,5 хв. – 65°C; 0,5 хв. - 72°C
	1 цикл: 7 хв. – 72°C

Для детекції низькофункціонального алелю гена *UGT1A1* оптимізовано наступні температуро-часові параметри, які наведено в таблиці 2.6.

Таблиця 2. 6

Температуро-часові показники та кількість циклів ампліфікації фрагментів, що містять мутацію Н1069Q гена *ATP7B*

Ген, SNP	Температура – часові показники
<i>UGT1A1</i>	1 цикл: 15хв - 96°C
A(TA) ₆ TAA	35 циклів: 0,5хв. – 94°C; 0,5 хв. – 55°C; 0,5 хв. - 72°C
	1 цикл: 7 хв. – 72°C

Ідентифікація мутацій методом рестрикційного аналізу.

Даний метод аналізу нуклеотидної послідовності заснований на ампліфікації *in vitro* фрагмента послідовності ДНК гена, що містить ділянку локалізації мутації з наступним гідролізом продукту ПЛР ендонуклеазою

рестрикції, для якої з'являтися чи зникає сайт рестрикції. Знання про зміни ДНК, що виникають внаслідок певної мутації і підбір специфічної ендонуклеази, для якої відомий сайт рестрикції при певній мутації, дозволяє проводити детекцію цих мутацій методом аналізу ПДРФ (поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів).

Інкубацію рестрикційної суміші з рестриктазами проводили відповідно до рекомендацій фірм - виробників в термостаті фірми «ВІОКОМ» (Росія) при оптимальній для ферменту температурі. Перелік використаних у роботі ендонуклеаз рестрикції та мутацій, які аналізувались наведено в таблиці 2.6.

Таблиця 2.6

Перелік ендонуклеаз використаних для рестрикції

Назви ферментів	Назви генів та мутацій	Температура активності, °C
BsII	<i>HFE H63D</i>	65°C
RsaI	<i>HFE C282Y</i>	37°C
MwoI	<i>ATP7B c.2304dupC</i>	37°C

У роботі використовували ендонуклеази рестрикції фірми "Fermentas" (Вільнюс). Для реакції брали 15 мкл ПЛР продукту певної ділянки ДНК, в межах якої могла б виникнути та чи інша мутація. Реакційна суміш містила 0,2-1 мкг ДНК. Додавали до розчину ДНК воду до об'єму 18 мкл та перемішували. Додавали 2 мкл буферу для рестрикції (10мМ трис-НСl, рН 7,4, 10мМ MgCl₂, 100 мкг/мл бичачого альбуміну, 1мМ дитіотрийтол) та 1 – 2 одиниці активності відповідної ендонуклеази рестрикції та перемішували (1 одиниця ферменту - це його кількість, яка необхідна для повного розщеплення 1мкг ДНК за одну годину в певному буфері при оптимальній температурі в об'ємі 20 мкл). Аналіз продуктів ПЛР проводили шляхом електрофорезу.

Електрофоретичне фракціонування фрагментів ДНК.

Фрагменти ДНК, які були синтезовані в ході ПЛР (копії досліджуваних ділянок ДНК), знаходяться у ампліфікаційній суміші у кількості, яка є доступною для якісної оцінки та аналізу нуклеотидного складу. Оскільки фрагменти ДНК є від'ємно зарядженими молекулами, для їх подальшого аналізу ампліфікаційні продукти фракціонують за їх довжиною (звичайний фрагментний аналіз), або конформацією просторових структур із використанням різних видів електрофорезів. На електрофореграмі візуалізують смуги (зони локалізації фрагментів одного розміру або конформації) із допомогою флуоресцентного барвника броміду етидія та реєструють фотографічно в УФ-світлі. Крім того реєстрація фрагментів ПЛР може відбуватися за допомогою різних типів автоматичних аналізаторів. У роботі використовувався фрагментний аналіз в горизонтальному агарозному гелі та в неденатуруючому поліакриламідному гелі. [139]

Аналіз тотальної ДНК та продуктів ПЛР шляхом горизонтального агарозного електрофорезу.

Електрофорез проводили у 0,8% (для перевірки якості тотальної ДНК), 1,5% (для перевірки наявності та специфічності продуктів після ПЛР) та 2,0% (для визначення мутацій) в агарозних гелях, приготованих на буфері ТБЕ (0,09М трис-НСІ, 0,09М борна кислота, 2мМ ЕДТА). В термостійку конічну колбу вносили агарозу і розчиняли в 100 мл 1xТБЕ буферу для електрофорезу. Ретельно перемішавши, колбу поміщали в мікрохвильову піч і доводили до кипіння. Даний крок повторювали ще раз. Після повного розчинення агарози, отриманий розчин охолоджували протягом 10-15 хв. До розчину агарози додавали 3-5 мкл бромистого етидію і ретельно перемішували обертальними рухами. Розплавлену агарозу заливали у формочку для гелю з певними гребінками.

Через 30 хв у ванночку апарата для горизонтального електрофореза фірми «Cleaver Scientific» (Великобританія) заливали 500мл 1X ТБЕ буферу для електрофорезу. У лунку вносили по 15 мкл ПЛР продукту. Електрофорез проводили протягом 30-40 хв при напрузі 100 V та сканували електрофореграму на ультрафіолетовому транслюмінаторі «ЕСХ-15. М» (VILBER LOURMAT, Франція). Отримані сигнали порівнювали з маркерами довжин і на основі цього визначали розміри отриманих фрагментів.

Електрофорез продуктів ПЛР в поліакриламідному гелі.

Для розділення продуктів ПЛР з малою молекулярною масою проводили електрофорез ДНК у 10% поліакриламідному гелі [132], приготованому на трис-боратному буфері, в апараті для вертикального електрофорезу фірми «HELICON» (Росія) з довжиною скла 20 см.

Для приготування 10% гелю змішували 15 мл 30% акриламід (акриламід-бісакриламід у співвідношенні 29:1), 20 мл дистильованої води, 5 мл 10ХТБЕ буферу, 90 мкл тетраетилендіаміду, 224 мкл 40% персульфату амонію.

Перед використанням гелю для розділення фрагментів ДНК проводили електрофорез протягом 20-30 хв. Електрофорез проводили при напрузі 100 V, поки зразок входив у гель та проходив 1 см від лунок. Після цього напруга збільшувалась до 250 V і проводили електрофорез протягом 5-6 год. Закінчували електрофорез при виході барвника бромфенолового синього з гелю. Гель фарбували водним розчином бромистого етидію та сканували в ультрафіолетовому транслюмінаторі. Результати сканування поліакриламідних гелів знімали цифровою камерою Gel Imager («HELICON», Росія) через червоний світлофільтр на ультрафіолетового транслюмінатора при довжині хвилі 256 нм. Обробку зображень здійснювали на комп'ютері за допомогою програм Adobe Photoshop CS та Gel Explorer 2.0.

Аналіз кривих плавлення високої роздільної здатності

Аналіз кривих плавлення з високою роздільною здатністю (HRM - high-resolution melting analysis) проводили на приладі CFX96 (BioRad, США), illumina (USA) з використанням набору для HRM EvaGreen Solis BioDye, Використаний у роботі метод дозволяє проводити ПЛР-аналіз із детекцією в режимі реального часу, генотипування і скринінг мутацій за допомогою аналізу кривих плавлення високої роздільної здатності для встановлення якісних та кількісних характеристик ДНК або РНК. [10]

Суть методу полягає у тому, що при плавленні дволанцюгові молекули ДНК змінюють свої оптичні характеристики. Це може бути пов'язано зі зміною в здатності зв'язувати молекули флуоресцентних барвників - інтеркаляторів, що володіють істотно більш високою флуоресценцією при з'єднанні з ДНК-дуплексом, і нижчою - у вільному стані - не пов'язаному з дуплексом. Заміна навіть одного нуклеотиду змінює температуру плавлення відповідного ДНК-дуплекса. Таким чином, моніторинг флуоресценції при різних значеннях температури свідчить про наявність в аналізованій суміші дволанцюгової молекули ДНК і визначає точку її плавлення. HRM дозволяє детектувати 98% всіх мутацій і алельних варіантів в досліджуваних ділянках. Висока чутливість методу дозволяє знаходити рідкісні перебудови [4].

Порівнянням кривих плавлення досліджуваних алелів з локусом з алелів дикого типу виявляли відмінності в первинній послідовності ДНК (мутації / поліморфізми). Перевагою даного методу є можливість проводити одночасно скринінг у значній кількості зразків ДНК та виявляти будь-які перебудови. Обмеженням даного методу є те, що після встановлення аберації у зразках необхідним є їх подальше секвенування з метою встановлення типу перебудови, що і проводили на наступних етапах [122].

Послідовності праймерів підбирали в програмі primer3 та reverse complement, перевіряли їх коректність в програмі primer3 Plus. Первинну послідовність ДНК брали з ресурсу NCBI. Олігонуклеотиди було очищено з

IDT (USA). 20 нг сумарної ДНК ампліфікувалася протягом 35-ти циклів в об'ємі 10 μL , що включав 10X PCR buffer (Invitrogen, USA), 10 μM кожного з праймерів, 20 mM MgCl_2 , 10 μM dNTPs, та 5 U Taq ДНК полімерази (Invitrogen, USA). ДНК денатурували при температурі 95 °C протягом 12 хвилин. Наступні 35 циклів проходили з такими параметрами: 1 хв - 95°C, 1 хв - 62°C, та 1 хв - 72 C, останній цикл – 7 хв 72 °C. Ампліфікацію проводили в автоматичному режимі з використанням ампліфікатора в режимі реального часу illumina. Оптимізацію параметрів ПЛР проводили в дублях, в сумарному об'ємі реакційної суміші 10 μl з наступними компонентами: 2 μl 5 x HOT FIREpol EvaGreen HRM Mix (Solis Biodyne, EN), 20–30 нг геномної ДНК, 5 μl H_2O , 0,2 μl спермідину, 0,4 μl ROX та 0,2 μl кожного праймера.

У результаті роботи отримали фрагменти розміром 95 та 102 п.о відповідно (оптимальні для HRM – 85- 105 п.о). Після ампліфікації отримані фрагменти плавили при температурі від 55°C до 95°C з кроком 0.5 °C та затримкою 1 сек. Аналіз кривих плавлення проводили з використанням програмного забезпечення EcoStudy, розробленого компанією Illumina.

Послідовності праймерів, які були використані в роботі для HRM аналізу наведено в таблиці 2.7.

Таблиця 2.7.

Послідовності праймерів для HRM аналізу

Локус	Послідовність праймерів 5`-3`	Розмір ПЛП продукту	t° відпалу
АТР7В2304HL	СТСТGGTCATCCTGGTGGTT	95	60
АТР7В2304HR	GGCAATGAACACAAAGAGCA		
АТР7В3207HL	СССАAGTCCACGTACCTCTT	102	60
АТР7В3207HR	СТCAGGAAGGTTCTGGCTGT		
A(TA) ₇ TAAL	TGT TGC ATG AGA AAACGC CA	100	55
A(TA) ₇ TAAR	GTC GCC TGT TCA CCA AGG AT		

Аналіз MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification)

MLPA аналіз проводили із застосуванням набору SALSA MLPA KIT P091-B1 ATR7B (MRC-Нідерланди) на генетичному аналізаторі ABI-3130XL (3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems, США) та SEQSTUDIO genetic analyzer. Даний метод дозволяє виявляти перебудови, які ведуть до вкорочення (делеції) чи навпаки здовження (дуплікації) ділянок ДНК. Даний метод був використаний для пошуку делецій/дуплікацій у межах гена *ATR7B*, оскільки такі перебудови, особливо великі, не виявляються іншими методиками аналізу первинної послідовності нуклеїнових кислот.

Секвенування ампліфікованих послідовностей ДНК методом Сенгера

Автоматичне секвенування проводили методом капілярного електрофорезу на приладі 3130xl ABI-3130XL (3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems, США) на базі університету імені Пауля Страдина, м. Рига, Латвія, та SEQSTUDIO genetic analyzer на базі НМГЦ «Леоген», Львів. Для визначення характеру аберацій, що можуть спричиняти захворювання, проводили секвенування фрагментів ДНК. Для цього проводили ампліфікацію ДНК за допомогою ПЛР досліджуваної ділянки із специфічними олігонуклеотидними праймерами, які фланкували дану ділянку. Далі ПЛР продукт підлягав очищенню з допомогою набору Qiaex II kit (Qiagen, Hilden, Німеччина). Реакція секвенування проводилась з використанням набору “ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits” (Applied Biosystems).

Обробку хроматограм та множинне вирівнювання послідовностей проводили в програмі UGENE та MUSCLE: multiple sequence alignment. Аналіз отриманих перебудов проводили в on line режимі за допомогою баз даних ExAc, Mutation tester, ClinVar. Provean, Pylo Phen. Мутація, яка спричиняє зсув рамки зчитування, вважалась патогенною. Аналіз мутацій проводили з використанням референтної послідовності гена *ATR7B* людини (NM_000053) у

програмі UGENE. Номенклатура виявлених перебудов записувалась відповідно до стандартів HGVS. Оцінка клінічного значення проводилась відповідно до рекомендацій Американського коледжу медичної генетики: Згідно їх даних патогенними варіантами (мутація) є описані чи ідентичні описаним раніше варіантам, для яких доведено, що вони спричиняють певне захворювання, тобто спричиняють фенотиповий прояв ознаки. Ймовірно патогенними є варіанти, які ніколи раніше не були знайдені, однак вони знаходяться в гені, який, як відомо, спричиняє захворювання, і, схоже, впливає на важливу структуру або функцію кодованого білка. Невизначеного значення (VUS) є варіанти, про які раніше не повідомлялося. Ці варіанти зумовлюють зміну амінокислотної послідовності у відповідному білку. Ймовірно доброякісні (likely benign) - відомі варіанти, які не є рідкісними, для яких аналізом *in silico* передбачається доброякісний вплив на кодований білок. Доброякісні (нейтральний) (benign) - відомі варіанти, з більшою частотою; при аналізі *in silico* передбачається доброякісний вплив на кодований білок, а також є дані, що брати чи сестри пацієнта з однаковими симптомами захворювання не мають цього варіанту [15].

Полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі (RT-PCR)

ПЛР в режимі реального часу дозволяє виміряти кількісно вміст специфічного фрагменту ДНК у пробі. qPCR — підвид полімеразної ланцюгової реакції, при якій після кожного циклу ампліфікації проводиться зчитування сигналу, тобто спостерігається наростання продукту по мірі ампліфікації - "у реальному часі"[11].

РТ ПЛР проводили в автоматичному режимі на приладі CFX96 (BioRad, США) з використанням набору для qPCR SYBR Solis BioDye, використовуючи адаптований протокол виробника.

Система ПЛР у реальному часі ґрунтується на виявленні та кількісній оцінці флуоресцентного репортера. Цей сигнал збільшується прямо пропорційно кількості ПЛР продукту в реакції. Зчитуючи кількість

флуоресценції на кожному циклі, можна контролювати реакцію ПЛР під час експоненціальної фази, коли перше значне збільшення кількості продукту ПЛР співвідноситься з початковою кількістю цільового шаблону. Чим більша кількість вихідної копії мішені нуклеїнової кислоти, тим швидше спостерігається значне збільшення флуоресценції. Значне збільшення флуоресценції вище базового значення, виміряне протягом 3-15 циклів, свідчить про виявлення накопиченого продукту ПЛР [41].

KASP (конкурентна алель специфічна ПЛР)

У ході роботи було використано ще один метод діагностики –KASP. Даний метод використовують для пошуку одночасно кількох поліморфізмів в аналізованих фрагментах ДНК [14]. Послідовності праймерів (таблиця 2.8.) були підібрані самостійно в програмі primer 3 plus.

Таблиця 2.8

Праймери для KASP генотипування

Локус	Послідовність праймерів 5`-3`	Розмір продукту	t° відпалу
АТР7В2304KL_C АТР7В2304KL_A	L_C: ACATTCTTCGACACGCCCCCCC L_A: ACATTCTTCGACACGCCCCCCA R: GGAGCAGCTCTTTTCTGAACCTGA	108	65-72
АТР7В3207KL_G АТР7В3207KL_A	L_G: TGGTGACTGCCACGCCCAAG L_T: TGGTGACTGCCACGCCCAAT R: CCACACTGCCCTCAGGAAG	84	65-70

2.2.3 Популяційно-генетичний аналіз

У досліджуваних вибірках було визначено частоти генотипів і відповідно алелів досліджених мутацій. Для перевірки відповідності розподілу частот алелів та генотипів закону Харді-Вайнберга і порівняння рядів розподілів використовувався критерій χ^2 .

Закон Харді-Вайнберга:

$$p + q = 1,$$

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1,$$

де p^2 — частота, з якою зустрічаються носії генотипу AA, $2pq$ — генотипів

Aa та aA, q^2 — з генотипом aa, p — частота алелю дикого типу, q — частота мутантного алелю[142].

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1 Частота алельних варіантів генів-кандидатів ідіопатичних гепатобіліарних порушень серед практично здорових осіб

Для диференційної діагностики осіб із гепатобіліарними порушеннями нез'ясованого генезу, спершу вирішили встановити частоту мутацій генів-кандидатів ідіопатичних гепатобіліарних порушень серед вибірки практично здорових осіб, для прогнозування поширеності захворювання серед дослідної групи. Для дослідження обрали три поширені спадкові захворювання, які найбільше підходили для нашої дослідної групи, а саме хвороба Вільсона-Коновалова (середній вік маніфестації – 20-30 років, перші симптоми 10-15 років), спадковий гемахроматоз (середній вік маніфестації 20-30 років, у жінок після менопаузи) та синдром Жильбера (вік маніфестації 15-18 років). Дослідження почали з встановлення частоти переважаючої для європейської популяції мутації с.3207C>A гена *ATP7B*, що спричиняє розвиток хвороби Вільсона.

3.1.1. Аналіз частоти алелів та генотипів варіанту с.3207C>A гена *ATP7B* серед вибірки практично здорових жителів Західної України

Для встановлення гетерозиготного носійства мутації с.3207C>A гена *ATP7B* сформували вибірку, в яку ввійшло 800 практично здорових осіб, жителів Західного регіону України, віком від 25 до 35 років, з них 500 жіночої статі, 300 осіб чоловічої статі. Генотипування проводили методом двонаправленої ампліфікації специфічних алелей, використовуючи два пари праймерів: зовнішню і внутрішню. У роботі використовували дві запропоновані методики: Polakova, 2007 та Krutina, 2008. Перший автор пропонував використовувати менші фрагменти ПЛР. У результаті ПЛР перша пара

праймерів синтезує матрицю для другої пари праймерів, що слугує само підсиленням реакції. Перша пара праймерів синтезувала продукт розміром 242 пар основ. Друга пара праймерів за наявності мутації в гетерозиготному стані ініціювала синтез в двох напрямках і в результаті цього отримували два фрагменти розміром 111 та 142 пари основ. Фрагмент ДНК, який синтезується на основі попереднього фрагмента внутрішньою парою праймерів за наявності заміни цитозину на аденін в позиції 3207 кДНК відбувається в двох напрямках: від місця заміни у напрямку upstream, а нормальний алель синтезується в напрямку down stream. Обмежуються дані фрагменти зовнішньою парою праймерів. Схематичне зображення PCR Vi-PASA наведено на рис. 3. 1

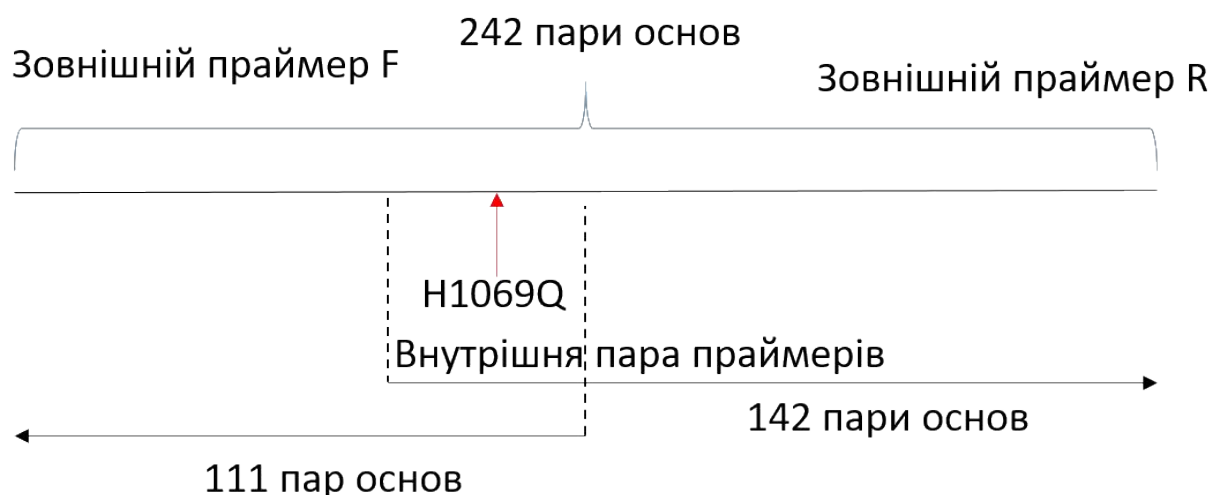


Рис.3. 1. Схематичне зображення PCR Vi-PASA.

Розділення таких фрагментів найкраще проводити у 8% ПААГ чи 4% агарозному гелі. Електрофореграму детекції мутації наведено на рис.3. 2.

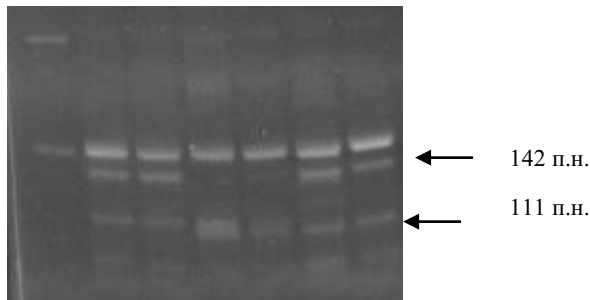


Рис.3. 2. Електрофореграма детекції мутації Н1069Q (*c.3207 C>A*) гена *АТР7В*. 1-Маркер молекулярної ваги 100 бр, 2, 6 – відсутність мутації Н1069Q (генотип *c.3207 CC*), генотип 3, 5 – наявність мутації Н1069Q в гетерозиготному стані (генотип *c.3207 СА*), 4 – наявність мутації Н1069Q в гомозиготному стані (генотип *c.3207 АА*).

Дана методика має певні обмеження, а саме потребує аналізу в 8% ПААГ чи 4% агарозному гелі та більшу тривалість розділення фрагментів, тобто збільшується сумарний час аналізу. Для дослідження великої вибірки методично зручніше працювати з більшими фрагментами, між якими більша різниця. Тому для покращення та спрощення роботи нами було знайдено інші пари праймерів, які дозволяють отримати фрагменти більшого розміру та краще візуально аналізувати. Крім того, для їх розділення достатньо 2% агарозного гелю, менший час електрофоретичного розділення та менший сумарний час аналізу. Електрофореграму детекції мутації наведено на рис.3.3.

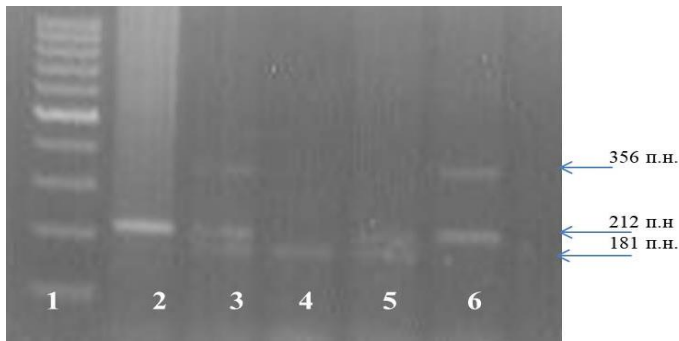


Рис.3. 3. Електрофореграма детекції мутації Н1069Q (*c.3207 C>A*) гена *ATP7B*. 1-Маркер молекулярної ваги 100 bp, 2, 6 – відсутність мутації Н1069Q (генотип *c.3207 CC*), генотип 3, 5 – наявність мутації Н1069Q в гетерозиготному стані (генотип *c.3207 CA*), 4 – наявність мутації Н1069Q в гомозиготному стані (генотип *c.3207 AA*).

Таким чином було проведено генотипування мутації *c.3207C>A* гена *ATP7B* серед 800 практично здорових осіб. У результати дослідження виявили 14 випадків мутації в гетерозиготному стані. Результати генотипування мутації *c.3207C>A* гена *ATP7B* серед вибірки практично здорових мешканців західних областей України наведено в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1.

Частота алелів та генотипів за мутацією с.3207С>А гена *ATP7B* серед вибірки практично здорових мешканців західних областей України ($n=800$)

Генотипи	3207CC	3207AC	3207AA
$n_{жін.}$ (%)	491 (98,2)	9 (1,8)	0 (0)
$n_{чол.}$ (%)	295 (98,33)	5 (1,67)	0 (0)
$n_{факт.}$ (%)	786 (98,25)	14 (1,75)	0 (0)
$n_{теор.}$ (%)	786,06 (98,258)	13,8775 (1,735)	0,06125 (0,007)
$\chi^2_{факт.}$	0,061791*		
Алелі	3207C	3207A	
Частота	0,99125	0,00875	

Примітки:

1. $n_{жін.}$ – фактична кількість жінок у вибірці з означеним генотипом;
2. $n_{чол.}$ – кількість чоловіків у вибірці з означеним генотипом;
3. $n_{факт.}$ – фактична кількість осіб у вибірці з означеним генотипом;
4. $n_{теор.}$ – теоретично очікувана кількість осіб у вибірці з означеним генотипом;
5. * $p > 0,05$.

Отримані результати вказують на високу частоту (1:57) гетерозиготного генотипу мутації с.3207С>А гена *ATP7B* в нашій вибірці. У ході дослідження у жодної особи не було виявлено мутації с.3207С>А в гомозиготному стані, що може бути пов'язано з повною пенетрантністю мутації с.3207С>А в гомозиготному стані. А також вказувати на те, що підібрана контрольна група, відображає реальну частоту гетерозиготних носіїв, оскільки середній вік маніфестації захворювання 20-30 років, а середній вік осіб дослідної групи 25-35 років, тобто старше віку маніфестації. Мутація виявлялась з однаковою частотою в осіб жіночої та чоловічої статі.

Зважаючи на широкий спектр мутацій, описаних в цьому гені (більше 300, для яких встановлено роль у розвитку захворювання), очікується вища частота захворювання в нашій популяції.

Отримані частоти даних алелей локусу $c.3207C>A$ гена *ATP7B* відповідають рівновазі Харді-Вайнберга. Також фактичні частоти генотипів відповідають теоретично очікуваним.

Таким чином, поширюваність захворювання в досліджуваній вибірці дорослих практично здорових осіб середнього віку буде становити 1:13061 за умов повної пенетрантності, що приблизно в два рази вище даних літератури [144]. Отримані дані можуть вказувати на низьку настороженість лікарів щодо даної нозології, і відповідно її гіподіагностику. Висока частота гетерозиготних носіїв вказує на доцільність її тестування серед осіб високого ризику хвороби Вільсона з України.

Наступним етапом роботи є встановлення популяційної частоти мутації $c.845G>A$ та $c.187C>G$ гена *HFE*, які є причиною розвитку спадкового гемахроматозу.

3.1.2 Аналіз частоти та генотипів мутацій $c.845G>A$ та $c.187C>G$ гена *HFE* серед вибірки практично здорових мешканців західних областей України

Для тестування мутацій $c.187C>G$ та $c.845G>A$ гена *HFE* було сформовано вибірку з 280 практично здорових жителів України, віком від 25 до 35 років. Генотипування проводили методом ПЛР з подальшим ПДРФ аналізом у 2% агарозному гелі.

Для детекції мутації $c.187C>G$ ПЛР продукти обробляли ендонуклеазою рестрикції *VclI*. У результаті ПЛР синтезується продукт розміном 208 пар нуклеотидів. Даний фрагмент ДНК містить два сайти для ендонуклеази рестрикції *VclI*. За наявності предкового генотипу в гомозиготному стані на електрофореграмі візуалізується продукт розміром 138 п.н. та 70 п.н. За наявності заміни цитозину на гуанін в позиції 187 в гомозиготному стані в даному фрагменті ДНК порушується сайт рестрикції і на електрофореграмі візуалізується продукт розміром 208 пар основ. Порівнюючи з маркером молекулярної ваги робимо висновки про генотипи досліджуваних зразків.

Електрофореграму детекції мутацій $c.187C>G$ гена *HFE* наведено на рис. 3. 4.

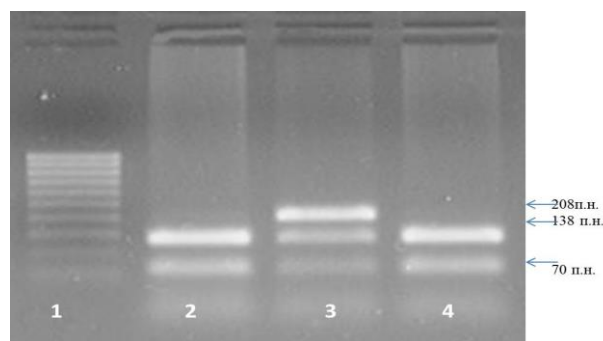


Рис. 3. 4.

Електрофореграма рестрикційних *Vcl I* фрагментів продукту ампліфікації послідовності гена *HFE* (2% агарозний гель): 1 – маркер молекулярної ваги 50 bp Ladder. 3 – наявність мутації $c.187C>G$ у гетерозиготному стані, 2, 4 – відсутність мутації $c.187C>G$.

Для детекції мутації *c.845G>A* ПЛР продукти обробляли ендонуклеазою рестрикції *Rsa I*. Електрофореграму детекції мутації *c.845G>A* гена *HFE* наведено на рис.3. 5

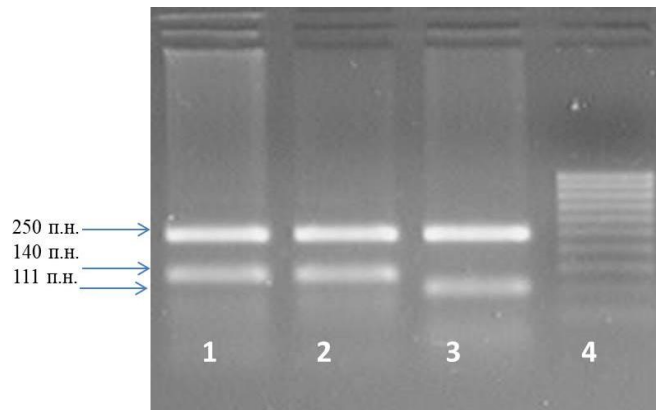


Рис.3. 5. Електрофореграма рестрикційних *Rsa I* фрагментів продукту ампліфікації послідовності гена *HFE* (2% агарозний гель): 1, 2 – відсутність мутації *c.845G>A*; 3 – наявність мутації *c.845G>A* в гомозиготному стані; 4 – маркер молекулярної ваги (50 bp Ladder).

У результаті ПЛР синтезується продукт розміном 387 пар нуклеотидів. Даний фрагмент ДНК містить один сайт для ендонуклеази рестрикції *Rsa I*. За наявності предкового генотипу в гомозиготному стані на електрофореграмі візуалізується продукт розміром 250 п.н. та 140 п.н. За наявності заміни гуаніну на аденін в позиції 845 в гомозиготному стані в даному фрагменті ДНК з'являється сайт рестрикції для ендонуклеази *RsaI* і на електрофореграмі візуалізується продукт розміром 250, 111 і 38 пар основ. Порівнюючи з маркером молекулярної маси робимо висновки про генотипи досліджуваних зразків.

Серед обстежених виявлено 7 носіїв мутації *c.845G>A* в гетерозиготному стані. У жодної особи не було виявлено даного варіанту в гомозиготному стані. Мутацію *c.187C>G* гена *HFE* виявляли частіше: у 75 осіб в гетерозиготному стані, у 3-х осіб в гомозиготному стані. Це може бути пов'язано з низькою пенетрантністю варіанту, що за даними низки авторів трактується як нейтральний поліморфізм. Результати генотипування мутацій *c.845G>A* та

c.187C>G гена *HFE* серед вибірки практично здорових мешканців західних областей України наведено в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2.

Частота алелів та генотипів за мутацією c.845G>A гена *HFE* серед вибірки практично здорових жителів Західної України ($n = 280$)

Генотипи	<i>GG</i>	<i>AG</i>	<i>AA</i>
$n_{жін.}$ (%)	127 (98,45)	2 (1,55)	0 (0)
$n_{чол.}$ (%)	146 (96,69)	5 (3,31)	0 (0)
$n_{факт.}$ (%)	273 (97,5)	7 (2,5)	0 (0)
$n_{теор.}$ (%)	273,044 (97,516)	6,912 (2,468)	0,044 (0,016)
$\chi^2_{факт.}$	0,044304*		
Алелі	<i>G</i>	<i>A</i>	
Частота	0,9875	0,0125	

Примітки:

1. $n_{жін.}$ – фактична кількість жінок у вибірці з означеним генотипом;
2. $n_{чол.}$ – кількість чоловіків у вибірці з означеним генотипом;
3. $n_{факт.}$ – фактична кількість осіб у вибірці з означеним генотипом;
4. $n_{теор.}$ – теоретично очікувана кількість осіб у вибірці з означеним генотипом;
5. * $p > 0,05$.

Встановлено частоту алеля c.845A гена *HFE* у загальній вибірці жителів західного регіону України на рівні 1,3%. Частота гетерозиготного генотипу *845GA* становить 2,5% (1:40). Виявлена у роботі частота мутації c.845G>A гена

HFE є подібною до даних у інших популяціях та етнічних групах [32]. У жодної особи не було виявлено даного варіанту в гомозиготному стані.

Таблиця 3.3.

Частота алелів та генотипів за мутацією с.187C>G гена *HFE* серед вибірки практично здорових жителів Західної України ($n = 280$)

Генотипи	<i>187CC</i>	<i>187GC</i>	<i>187GG</i>
$n_{жін.}$ (%)	89 (68,99)	38 (29,46)	2 (1,55)
$n_{чол.}$ (%)	114 (75,49)	36 (23,84)	1 (0,67)
$n_{факт.}$ (%)	202 (72,14)	75 (26,79)	3 (1,07)
$n_{теор.}$ (%)	204,858 (73,164)	69,284 (24,744)	5,858 (2,092)
$\chi^2_{факт.}$	1,168671*		
Алелі	<i>187C</i>	<i>187G</i>	
Частота	0,855	0,145	

Примітки:

1. $n_{жін.}$ – фактична кількість жінок у вибірці з означеним генотипом;
2. $n_{чол.}$ – кількість чоловіків у вибірці з означеним генотипом;
3. $n_{факт.}$ – фактична кількість осіб у вибірці з означеним генотипом;
4. $n_{теор.}$ – теоретично очікувана кількість осіб у вибірці з означеним генотипом;
5. * $p > 0,05$.

Частота генотипу с.187CG, с.187GG в досліджуваній вибірці становить 27,9%. Отримані у роботі результати вказують на високу частоту алеля 187G гена *HFE* серед жителів Західної України: практично кожен четвертий є гетерозиготним носієм цього алеля, що підтримує тезу про трактування заміни с.187C>G гена *HFE* як нейтрального поліморфізму.

Наступним етапом роботи було встановлення популяційної частоти алелю A(TA)₇TAA гена *UGT1A1*, який асоціюється з синдромом Жильбера (гіпербілірубінемія) серед практично здорових жителів з України.

3.1.3. Частота низько функціонального алелю A(TA)₇TAA гена *UGT1A1* серед практично здорових осіб

Матеріалом для дослідження були зразки банку ДНК лабораторії генетичних досліджень ДУ «Інститут спадкової патології НАМНУ» практично здорових осіб, жителів західних, центральних та східних областей.

Матеріалом для дослідження були зразки банку ДНК лабораторії генетичних досліджень ДУ «Інститут спадкової патології НАМНУ» практично здорових осіб, жителів західних, центральних та східних областей. Молекулярно–генетичне дослідження алелей A(TA)₆TAA та A(TA)₇TAA гена *UGT1A1* проведено у 196 практично здорових осіб віком від 25 до 35 років, серед них 136 жінок, 60 чоловіків. Ампліфікацію специфічних послідовностей проводили методом ПЛР з візуалізацією в 10% ПААГ. Наявність на електрофореграмі фрагмента розміром 98 bp відповідає генотипу дикого типу A(TA)₆TAA гена *UGT1A1*. Додаткова копія TA повтору в промоторній ділянці гена відповідає фрагменту розміром 100 bp. Наявність низько функціонального алелю A(TA)₇TAA в гетерозиготному стані відповідає двом фрагментам 98 та 100 bp, а також появою гетеродуплексів. Електрофореграму гетеродуплексного аналізу алелей A(TA)₆TAA та A(TA)₇TAA гена *UGT1A1* наведено на рис. 3. 6.

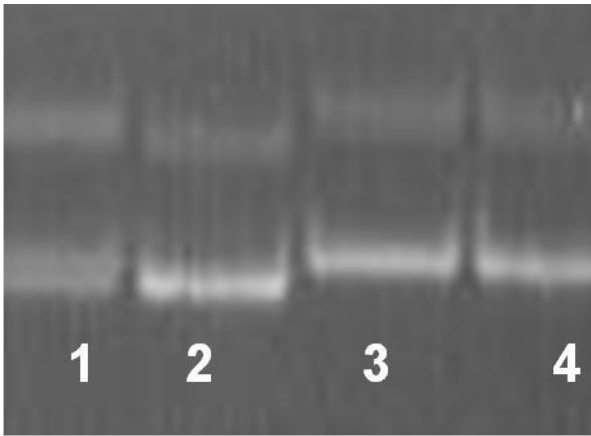


Рис. 3. 6. Електрофореграма гетеродуплексного аналізу алелей А(ТА)6ТАА та А(ТА)7ТАА) гена UGT1A1. 1- генотип А(ТА)6ТАА/А(ТА)7ТАА, 2 - генотип А(ТА)6ТАА/А(ТА)6ТАА, 3-4 - генотип А(ТА)7ТАА/А(ТА)7ТАА.

Паралельно проведено HRM аналіз кривих плавлення продуктів ампліфікації фрагмента гена, що містить промоторну послідовність. Методика базується на різниці плавлення нуклеотидів. Два водневі зв'язки денатурують при нижчій температурі, ніж три. Також інсерції чи делеції будуть різнитись за температурами плавлення кривих. На основі різних температур плавлення фрагмента ДНК робили висновки про генотипи зразків. Криві плавлення наведено на рис. 3. 7.

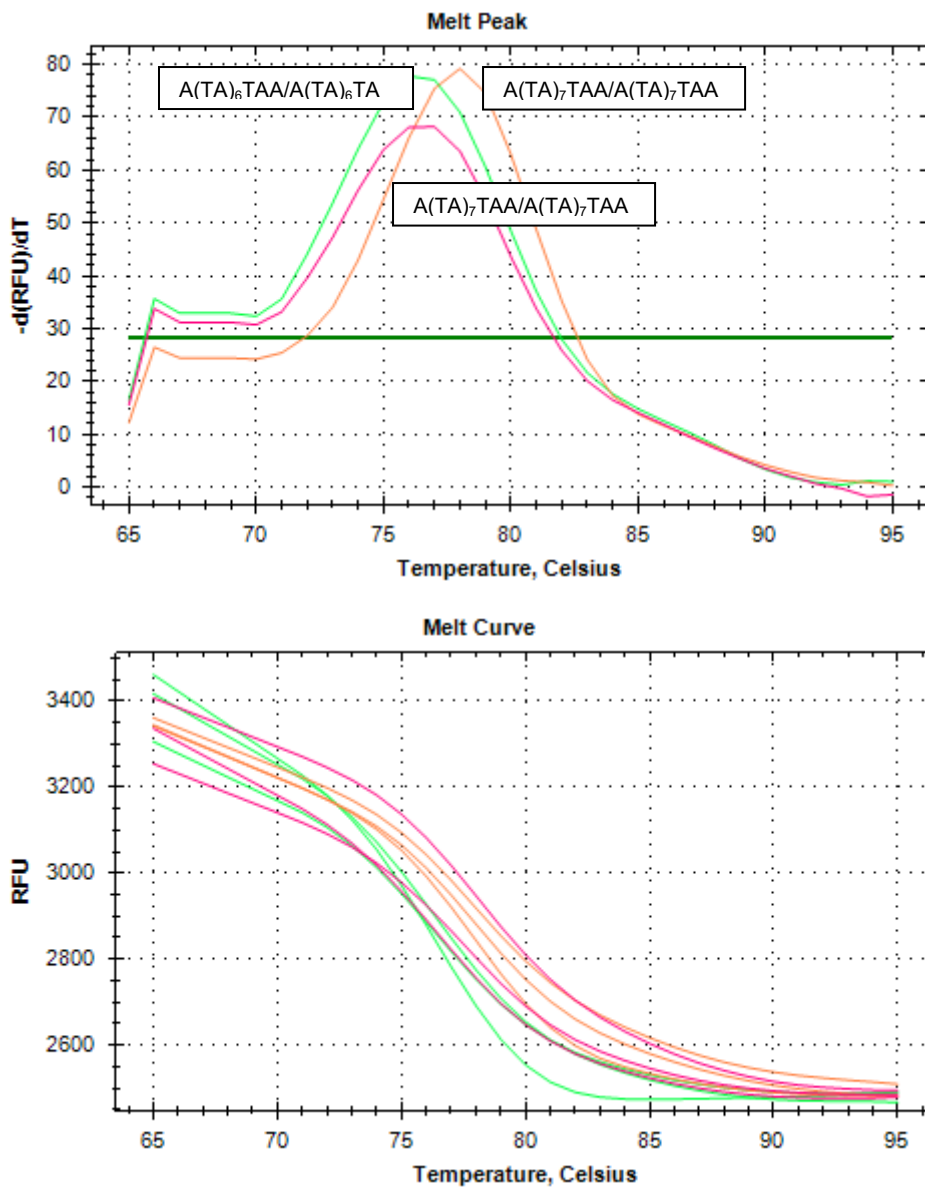


Рис. 3. 7. Результати HRM аналізу (аналіз кривих плавлення високої роздільної здатності) продуктів ампліфікації фрагмента промотора гена UGT1A1 при різних генотипах: A(TA)₆TAA/A(TA)₆TAA, A(TA)₆TAA/A(TA)₇TAA та A(TA)₇TAA/A(TA)₇TAA.

Отримані криві правлення фрагмента ДНК промоторної ділянки гена UGT1A1, який містить TA повтори показали, що нормальній кількості повторів A(TA)₆TAA в гомозиготному стані відповідає температура плавлення 76° С (зелений колір), варіанту в гетерозиготному стані відповідає температура плавлення 77° С (рожевий колір), генотипу A(TA)₇TAA в гомозиготному стані

відповідає крива плавлення 78°C (оранжевий колір). Відмінність в температурі плавлення гомозиготного A(TA)₆TAA та гетерозиготного A(TA)₆TAA/A(TA)₇TAA становить 1°C та є важкою для візуальної диференціації. Проте, різниця в температурах плавлення визначається автоматично. Диференціювання низько функціонального алелю в гетерозиготному стані візуально не вдалось. Подальше доопрацювання методики слід спрямувати на збільшення різниці в температурах плавлення між генотипами A(TA)₆TAA/A(TA)₆TAA, A(TA)₆TAA/A(TA)₇TAA та A(TA)₇TAA/A(TA)₇TAA, що можна досягнути зміною праймерів, параметрів ПЛР та кроку плавлення ДНК.

У результаті проведеного дослідження серед жителів Західного регіону України алель предкового типу в гомозиготному стані виявили у 82 осіб серед 196 обстежених. У 23 осіб виявлено A(TA)₇TAA алель-ризик у гомозиготному стані та 91 особа були гетерозиготами. Результати генотипування алелю A(TA)₇TAA гена *UGT1A1* наведено в таблиці 3. 3.

Таблиця 3.3.

Частота алелів та генотипів за поліморфним варіантом rs8175347 гена *UGT1A1* серед практично здорових осіб ($n = 196$)

Генотипи	$A(TA)_6TAA / A(TA)_6TAA$	$A(TA)_6TAA / A(TA)_7TAA$	$A(TA)_7TAA / A(TA)_7TAA$
$n_{факт.} (\%)$	82 (41,84)	91 (46,43)	23 (11,73)
$n_{теор.} (\%)$	82,94 (42,316)	89,12 (45,469)	23,94 (12,215)
$\chi^2_{факт.}$	0,043808*		
Алелі	$A(TA)_6TAA$	$A(TA)_7TAA$	
Частота	0,65	0,35	

Примітки:

1. $n_{факт.}$ – фактична кількість осіб у вибірці з означеним генотипом;
2. $n_{теор.}$ – теоретично очікувана кількість осіб у вибірці з означеним генотипом;
5. * $p > 0,05$.

Як видно з даних, наведених в таблиці 3.4, частота алелю ризику $A(TA)_7TAA$ становить 0,35, частота алелю дикого типу становить 0,65. Отримані частоти генотипів відповідають рівновазі Харді-Вайнберга. Аналіз відповідності фактичних частот генотипів теоретично очікуваним в обох популяційних вибірках свідчить про випадковий розподіл генотипів у відповідності з розподілом Харді-Вайнберга.

Частота алелю-ризик $A(TA)_7TAA$ в нашій популяції становить 0,35, що нижче, ніж у Румунії (0,436 у вибірці 605 обстежених осіб), у Польщі (0,412 серед 78 обстежених), Сербії (0,403 серед 100 обстежених) та інших країнах, але вище, ніж серед африканських країн, для яких частота мутантного алелю становить 0,31, що може пояснюватись тим, що для їхньої популяції характерні інші алельні варіанти цього гена, а тому числі $A(TA)_5TAA$ та $A(TA)_8TAA$ [60].

Частота гомозиготного генотипу $A(TA)_7TAA/A(TA)_7TAA$, який асоціюється з розвитком синдрому Жильбера серед вибірки практично здорових жителів Західного регіону України становить 11,7%.

Отримані результати вказують на високу частоту мутантного алелю $A(TA)_7TAA$ гена *UGT1A1* та доцільність проведення генетичного тестування серед осіб з гепатобіліарними порушеннями нез'ясованого генезу.

Результати даного підрозділу представлено в наступних публікаціях:

1. Гайбонюк І.Є., Макух Г.В. Генотипування низько функціональної алелі $7(TA)$ гена *UGT1A1* серед вибірки практично здорових осіб Західного регіону України. *Вісник Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна, серія біологічна*. 2019. № 33. С.28-34.

2. Гайбонюк І.Є., Макух Г.В., Тиркус М.Я., Третяк Б.І., Яджин Л. М. Мутації Н1069Q гена *ATP7B* та С282У та Н63D гена *HFE* в осіб з гепатобіліарними захворюваннями нез'ясованого генезу. *Вісник проблем біології і медицини*. 2019. № 3 (152). с. 227-231.

3. Гайбонюк І.Є., Кравченко С.А., Макух Г.В., Дац –Опока М.І., Пампуха В.М.2, Третяк Б.І.1 , Кісель ік І.О. Частота асоційованого з синдромом Жильбера низько функціонального алелю $7(TA)$ гена *UGT1A1* (rs8175347) в Україні. *Вісник проблем біології і медицини*. 2020. Випуск 2 (156), С. 91-96.

3.2. Молекулярно-генетичний аналіз алельних варіантів генів-кандидатів ідіопатичних гепатобіліарних порушень серед осіб дослідної групи

Зважаючи на високу популяційну частоту низькофункціонального алелю $A(TA)_7TAA$ гена *UGT1A1* (35,0%) обстеження дослідної групи почали саме з генотипування цього алелю. У дослідну групу включено 43 особи з гепатобіліарними порушенням, а саме ідіопатичною гіпербілірубінемією та

зміненим рівнем трансаміназ. Усім особам було виключено вірусні гепатити. Дослідження проводили методом ПЛР з подальшим аналізом в 10% ПААГ.

Результати дослідження наведено в таблиці 3. 4.

Таблиця 3.4.

Частота алелів та генотипів за поліморфним варіантом rs8175347 гена *UGT1A1* серед осіб з ідіопатичними гепатобіліарними порушеннями ($n = 43$)

Генотипи	$A(TA)_6TAA / A(TA)_6TAA$	$A(TA)_6TAA / A(TA)_7TAA$	$A(TA)_7TAA / A(TA)_7TAA$
$n_{факт.} (\%)$	16 (37,21)	23 (53,49)	4 (9,3)
$n_{теор.} (\%)$	17,59 (40,9)	19,82 (46,1)	5,59 (13,0)
$\chi^2_{факт.}$	0,573078*		
Алелі	$A(TA)_6TAA$	$A(TA)_7TAA$	
Частота	0,64	0,36	

Примітки:

1. $n_{факт.}$ – фактична кількість осіб у вибірці з означеним генотипом;
2. $n_{теор.}$ – теоретично очікувана кількість осіб у вибірці з означеним генотипом;
5. * $p > 0,05$.

Генетичне тестування алелю $A(TA)_7TAA$ гена *UGT1A1* серед осіб з ідіопатичними гепатобіліарними порушеннями показало низьку частоту цього алелю в гомозиготному стані серед досліджуваної вибірки – 9,2% (4/43), не зважаючи на встановлену високу частоту алелю $A(TA)_7TAA$ в популяції (35,0% - 165/488). Отримані результати генотипування алелю $A(TA)_7TAA$ в дослідній групі відповідають популяційній частоті цього генотипу, що вказує на низьку інформативність даного дослідження в нашій вибірці.

Зважаючи на високу частоту захворювання (1:500) наступним етапом дослідження було проведення генетичного тестування мутацій $c.845G > A$ та

c.187C>G гена *HFE* серед осіб з ідіопатичними гепатобіліарними порушеннями. У дослідну групу ввійшло 172 особи. Результати дослідження наведено в таблиці 3. 5.

Таблиця 3. 5.

Частота алелів та генотипів за поліморфним варіантом c.187C>G гена *HFE* серед осіб з ідіопатичними гепатобіліарними порушеннями ($n = 172$)

Генотипи	<i>187CC</i>	<i>187GC</i>	<i>187GG</i>
$n_{жін.}$ (%)	5 (22,72)	16 (72,73)	1 (4,55)
$n_{чол.}$ (%)	109 (72,67)	37 (24,67)	4 (2,66)
$n_{факт.}$ (%)	114 (66,278)	53 (30,81)	5 (2,91)
$n_{теор.}$ (%)	114,76 (66,73)	51,46 (29,92)	5,79 (3,35)
$\chi^2_{факт.}$	0,080121*		
Алелі	<i>187C</i>	<i>187G</i>	
Частота	0,817	0,183	

Примітки:

1. $n_{жін.}$ – фактична кількість жінок у вибірці з означеним генотипом;
2. $n_{чол.}$ – кількість чоловіків у вибірці з означеним генотипом;
3. $n_{факт.}$ – фактична кількість осіб у вибірці з означеним генотипом;
4. $n_{теор.}$ – теоретично очікувана кількість осіб у вибірці з означеним генотипом;
5. * $p > 0,05$.

Дані, наведені в таблиці 3.5 вказують на високу частоту гетерозиготного носійства різних алельних варіантів гена *HFE* серед осіб з гепатобіліарними порушеннями нез'ясованого генезу. Також варто відзначити, що жінки

скеровувались на це дослідження в 5 разів рідше, ніж чоловіки. Також лише для одної жінки діагноз вдалось підтвердити, оскільки у неї виявили мутацію *c.187C>G* в гомозиготному стані. Серед осіб жіночої статі з високою частотою виявляли мутацію *c.187C>G* в гетерозиготному стані (72,7%).

Зі 172 обстежених діагноз вдалось підтвердити у 5,8%, не зважаючи на високу частоту гетерозиготних носіїв цих варіантів в популяції.

Генотипування мутацій *c.845G>A* та *c.187C>G* гена *HFE* було проведено серед вибірки 43 осіб з гіпербілірубінемією. У результаті дослідження виявлено мутацію *c.845G>A* гена *HFE* в гетерозиготному стані, та у трьох осіб виявлено мутацію *c.187C>G* гена *HFE* в гетерозиготному стані. Встановлені частоти генотипів співпадають з частотою даних варіантів в популяції.

Було встановлено частоту мажорної мутації *c.3207C>A* гена *ATP7B* серед вибірки осіб з ідіопатичними гепатобіліарними порушеннями.

Дослідна група включала 96 осіб (44 чоловіків і 52 жінок). Генотипування проводили методом двонаправленої ампліфікації специфічних алелей (PCR Bi-PASA). Результати дослідження наведено в таблиці 3. 6.

Таблиця 3.6.

Частота алелів та генотипів за мутацією с.3207С>А гена *ATP7B* серед вибірки осіб з ідіопатичними гепатобіліарними порушеннями ($n=96$)

Генотипи	<i>3207CC</i>	<i>3207AC</i>	<i>3207AA</i>
$n_{жін.}$ (%)	48 (92,31)	3 (5,77)	1 (1,92)
$n_{чол.}$ (%)	39 (88,64)	4 (9,09)	1 (2,27)
$n_{факт.}$ (%)	87 (90,625)	7 (7,292)	2 (2,083)
$n_{теор.}$ (%)	85,31 (88,87)	10,37 (10,80)	0,315 (0,33)
$\chi^2_{факт.}$	1,896465*		
Алелі	<i>3207C</i>	<i>3207A</i>	
Частота	0,943	0,057	

Примітки:

1. $n_{жін.}$ – фактична кількість жінок у вибірці з означеним генотипом;
2. $n_{чол.}$ – кількість чоловіків у вибірці з означеним генотипом;
3. $n_{факт.}$ – фактична кількість осіб у вибірці з означеним генотипом;
4. $n_{теор.}$ – теоретично очікувана кількість осіб у вибірці з означеним генотипом;
5. * $p > 0,05$.

Отримані результати генотипування мутації с.3207С>А гена *ATP7B* серед осіб із ідіопатичними гепатобіліарними порушеннями вказують на високу частоту цього варіанту серед досліджуваної вибірки (5,7%).

З метою покращення діагностики хвороби Вільсона було апробувати метод HRM для аналізу мутацій 14 та 8 екзонів.

Для детекції патогенних варіантів 8-го (с.2304dupC) та 14-го екзонів (с.3207С>А, с.3191С>А) гена *ATP7B* нами було підібрано послідовності праймерів для HRM аналізу.

Дослідження розпочали з генотипування мутації с.3207С> А гена *ATP7B* (14-й екзон). Аналіз кривих плавлення 16-ти зразків ДНК дозволив встановити у п`яти осіб відмінності в температурах розходження ланцюгів. Криві плавлення наведено на рисунку 3.8. Відмінності позначено стрілками.

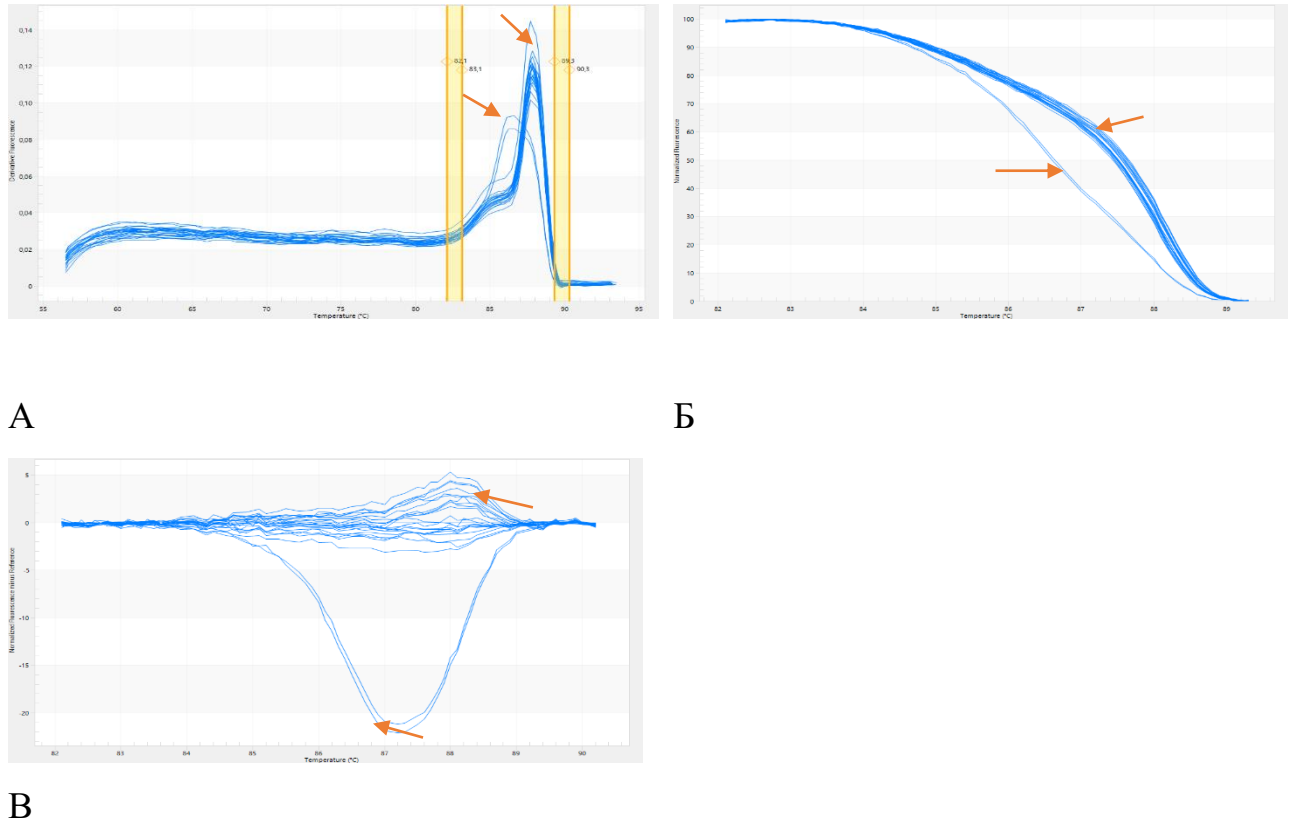


Рис.3.8. Результат аналізу кривих плавлення високої роздільної здатності фрагмента 14 екзону гена *ATP7B*. А- графік вихідної флуоресценції, Б – графік нормалізованої флуоресценції, В – графік нормалізованої флуоресценції відносно референсу.

Для верифікації методу паралельно було проведено генотипування даної мутації методом ПЛР *Bi-PASA*, який є рутинним в роботі лабораторії генетичних досліджень[139]. У даних п'яти осіб було виявлено мутацію *c.3207G>T* в гетерозиготному стані.

Отримані результати вказують на чутливість методу HRM для виявлення мутації *c.3207G>T*. Крім того, фрагмент ДНК, який ампліфікується для HRM аналізу, захоплює ще одну мутацію гена *ATP7B* 14-го екзону, а саме *c.3191A>C* (частота алелі (AF) - 0.00006). Зважаючи на переваги методу (виявлення різниці в плавленні ланцюгів в будь-якій позиції, яка охоплена праймерами) ми зможемо в одній реакції виявляти одразу два патогенні варіанти чи будь-які інші одонуклеотидні відмінності в цій ділянці гена. Метод HRM має свої

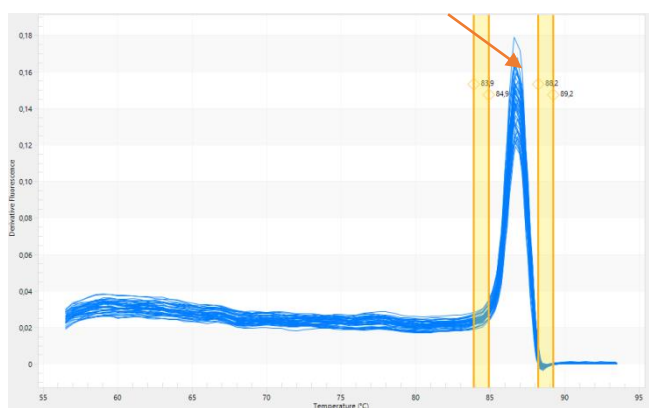
обмеження, і може використовуватися як скринінговий. Виявлені відмінності слід додатково верифікувати за допомогою таких методів як PCR Bi-PASA, ARMS, RFLP, секвенування за Сангером. Основною перевагою HRM є те, що він дозволяє проаналізувати одразу велику кількість зразків за короткий час.

За результатами HRM аналізу в усіх зразках ДНК контрольної групи спостерігали один пік плавлення та однотипну криву. Патогенний варіант с.3207G>Т гена *ATP7B*, не було виявлено серед осіб контрольної групи

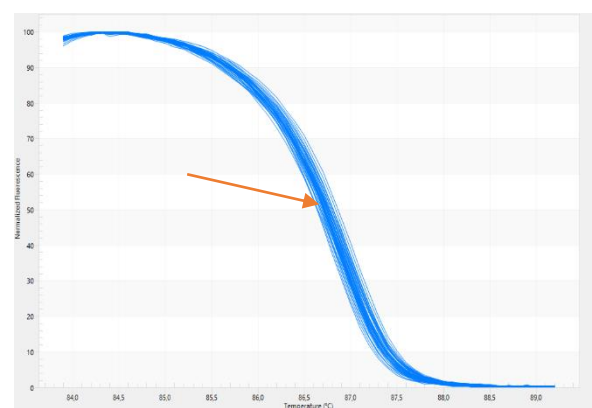
Дані зразки ДНК також паралельно генотипували методом PCR BI-PASA. Мутацій серед осіб контрольної групи виявлено не було, що підтверджує специфічність цього методу.

Для гена *ATP7B* характерна наявність «гарячих точок» виникнення мутацій; саме такою є послідовність 8 екзону гена, в якому повідомлено значну кількість різних патогенних варіантів.

Проводили аналіз кривих плавлення фрагментів ДНК 8-го екзону пацієнтів з ідіопатичними гепатобіліарними порушеннями. Результат не показав ніяких відмінностей у температурі розходження ланцюгів, що може вказувати на відсутність мутації с.2304dupC у даних осіб. Криві плавлення фрагментів ДНК 8-го екзону наведено на рисунку 3.9.



А.



Б.

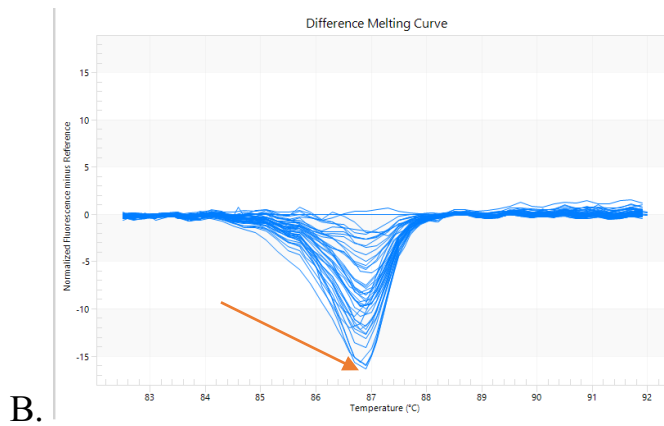


Рис.3.9. Результат аналізу кривих плавлення високої роздільної здатності фрагмента 8 екзону гена *ATP7B*. А- графік вихідної флуоресценції, Б – графік нормалізованої флуоресценції, В – графік нормалізованої флуоресценції відносно референсу.

Даний патогенний варіант не було виявлено серед осіб контрольної групи.

Дані зразки ДНК паралельно генотипували методом ARMS для встановлення достовірності методу HRM для цього патогенного варіанту. Серед досліджуваних зразків, генотипованих методом ARMS, мутацій виявлено не було. Електрофореграму наведено на рисунку 3.10.



Рис.3.10. Електрофореграма детекції мутації c.2304dupC методом ARMS. 3% агарозний гель. М-маркер молекулярної ваги.

Даний метод може бути застосований для скринінгового аналізу замін 14 та 8 екзонів.

Для покращення діагностики мутацій 8-го та 14-го екзонів, зниження вартості та можливості обстеження великої кількості зразків нами було апробовано метод KASP. Результати генотипування наведено на рис. 3.11. та 3.12.

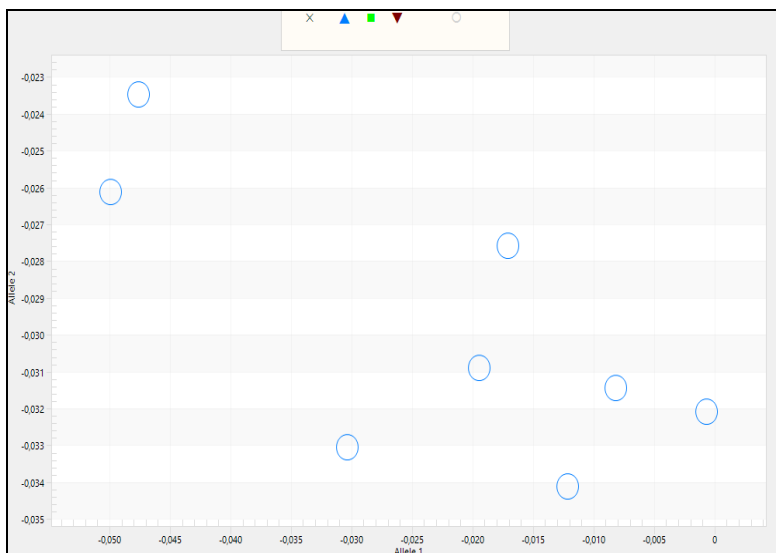


Рис.3.11. Кластеризація генотипів с.3207C>А гена *ATP7B*, отриманих методом конкурентної алель-специфічної реакції.

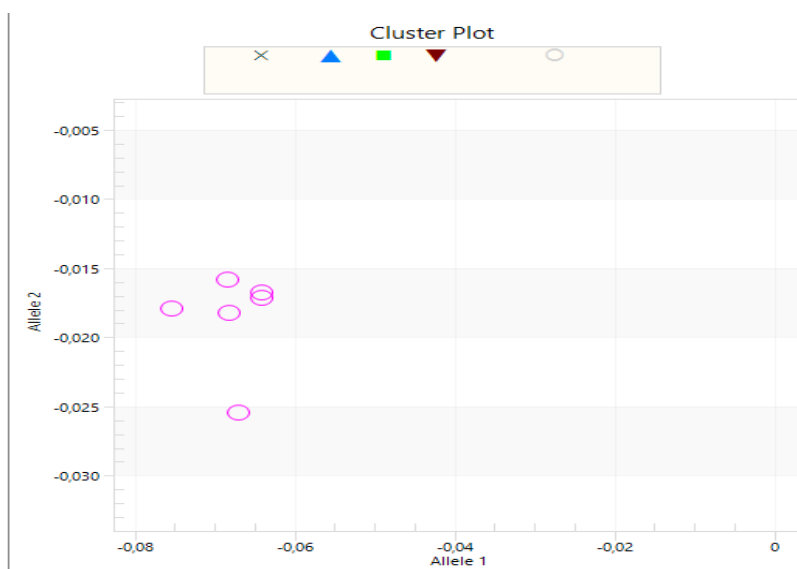


Рис. 3.12. Кластеризація генотипів с.2304dupC гена *ATP7B*, отриманих методом конкурентної алель-специфічної реакції.

Неможливо встановити чіткого розподілу генотипів на основі отриманих результатів, проте, спостерігається кластеризація сигналів. Метод показав себе як перспективний для подальших досліджень.

Результати даного підрозділу превставлено в наступних публікаціях:

1. Shymanska I., Tyrka M., Zastawna D., Makukh H., Tyrkus M. Approach of HRM analysis for *ATP7B* gene common variants screening. Book of Abstr. ESHG Conference, Vienna, Austria. June 11-14. 2022. E-P16-007.

3.3 Результати секвенування послідовності гена *ATP7B* серед осіб високого ризику розвитку хвороби Вільсона.

Серед 96 пацієнтів із гепатобіліарними порушеннями нез'ясованого генезу, які були обстежені на носійство найпоширеніших спадкових генетичних чинників лише ¼ частина (23 особи) становили групу високого ризику розвитку хвороби Вільсона, набравши 3 та більше балів за бальною шкалою діагностичних тестів. Базуючись на результатах генетичного аналізу та наявних клінічних проявів було відібрано групу пацієнтів для наступного етапу – секвенування екзонів. Характеристика пацієнтів, зразки ДНК яких були відібрані для повного секвенування гена *ATP7B*, наведена в таблиці 3.7.

Таблиця 3.7.

Характеристика групи пацієнтів, яким проведено повне секвенування гена *ATP7B*

Клінічні прояви	Гетерозиготи за мутацією с.3207C>A	Не виявлено мажорних мутацій
Загальна кількість, n	13	10
Наявність тільки неврологічних проявів	2/13	2/10
Наявність тільки печінкових проявів	9/13	7/10

Змішані симптоми	2/13	1/10
Середній вік на час звернення, (років)	31.3	25.8
Середній бал за системою Лейпциг	3.5-4	2.5-3

Секвенування гена розпочато з 8 та 14 екзонів гена *ATP7B*, оскільки за даними літератури саме в цих екзонах найчастіше зареєстровані патогенні мутації, які зумовлюють розвиток ХВ. У чотирьох пацієнтів виявлено однакову перебудову – вставку одного нуклеотида: цитозину в позиції 2304 яка асоціюється із ХВ. Мутація спричиняє зсув рамки зчитування у 8 екзоні та зміну амінокислотної послідовності білка (p.Glu770Argfs), і як наслідок порушення функціонування трансмембранного домену мідь зв'язуючої АТФ-ази Р-типу 7 класу. Хроматограму секвенування 8-го екзону гена *ATP7B*, що містить патогенний варіант с.2304dupC наведено на рис. 3. 13.

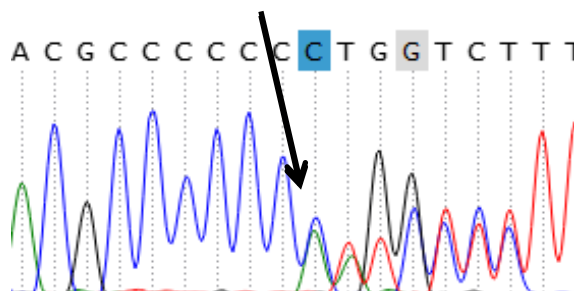


Рис. 3. 13. Хроматограма секвенування 8 екзону гена *ATP7B*, що містить мутацію с.2304dupC (CC[A/C]TG) у гетерозиготному стані.

В одного пацієнта виявлено в межах екзону 8 виявлено заміну гуаніну на аденін в позиції 2128 кДНК – мутація с.2128G>A. Ця перебудова зумовлює заміну гліцину в 710 позиції амінокислот на серин в трансмембранному домені мідь зв'язуючої АТФ-ази Р-типу 7 класу. Мутація описана в базі даних HGMD як патогенна (rs137853285). Хроматограма детекції мутації с.2128G>A гена *ATP7B* представлена на рис.3.14. Ця перебудова виявлена у 40 річного пацієнта з неврологічними ураженнями в компаунд гетерозиготному стані з мажорною мутацією с.3207C>A.

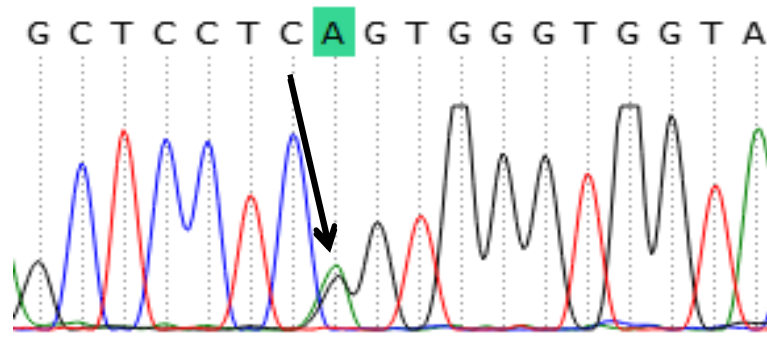


Рис. 3. 14. Хроматограма секвенування 8 екзону гена *ATP7B*, що містить мутацію с.2128G>A (TC[G/A]GT). Стрілка вказує місце перебудови.

Особам, у яких не виявили перебудов в екзонах 8 та 14 провели секвенування решти екзонів гена *ATP7B*. За результатами секвенування та порівняння з референтною послідовністю, в 9 екзоні гена не виявлено перебудов у жодному із зразків ДНК. Відповідно до даних літератури, в жителів європейської популяції мутації в цьому екзоні виявляються рідко. Секвенування цієї ділянки гена не є інформативне для досліджуваної популяції.

Проведено секвенування з 10 до 15 екзонів. У межах екзона 13 виявлено заміну аденіну на цитозин в положенні 3011 (с.3011A>C). Ця перебудова зумовлює заміну глутаміну в 1004 позиції амінокислот на пролін в металозв'язуючому домені АТФ-ази Р-типу 7 класу. Мутація описана в базі даних HGMD як патогенна (rs587783307). Хроматограма детекції мутації с.3011A>C гена *ATP7B* представлена на рис.3.15. Ця перебудова виявлена у пацієнта віком 27 років з асцитом нез'ясованого генезу в компаунд гетерозиготному стані з мажорною мутацією с.3207C>A. Хроматограма секвенування 13-го екзону, що містить перебудову с.3011A>C наведено на рис. 3. 10.

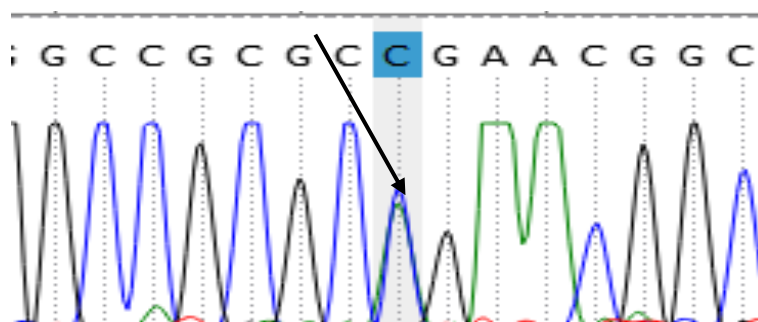


Рис. 3.15. Хроматограма секвенування 13 екзона гена *ATP7B*, що містить мутацію с.3011A>C (GC[A/C]GA). Стрілка вказує на місце перебудови.

У двох осіб в межах екзона 13 виявлено заміну аденіну на цитозин в положенні 2973 кДНК (с.2973A>C). Цей варіант не веде до зміни послідовностей амінокислот у білку і трактується у базах даних як однонуклеотидний поліморфізм rs1801248. У дослідженій вибірці ця однонуклеотидна заміна виявлена у двох пацієнтів в гетерозиготному стані та в одного - в гомозиготному. (рис.3.16).

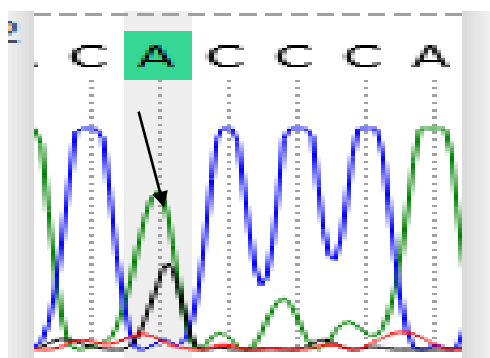


Рис. 3. 16. Хроматограма секвенування 13 екзона гена *ATP7B*, що містить SNP с.2973G>A (AC[G/A]CC) у гетерозиготному стані

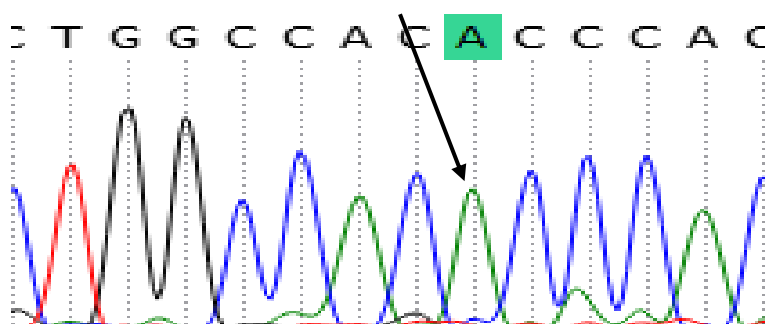


Рис. 3. 17. Хроматограма секвенування 13 екзона гена *ATP7B*, що містить SNP с.2973G>A (AC[G/A]CC) у гомозиготному стані

Також, виявлено двох осіб із заміною гуаніну на аденін в положенні 3009 гена *ATP7B*(с.3009G>A) в гетерозиготному стані. Хроматограму секвенування 13-го екзона, що містить варіант с.3009G>A наведено на рис.3.18.

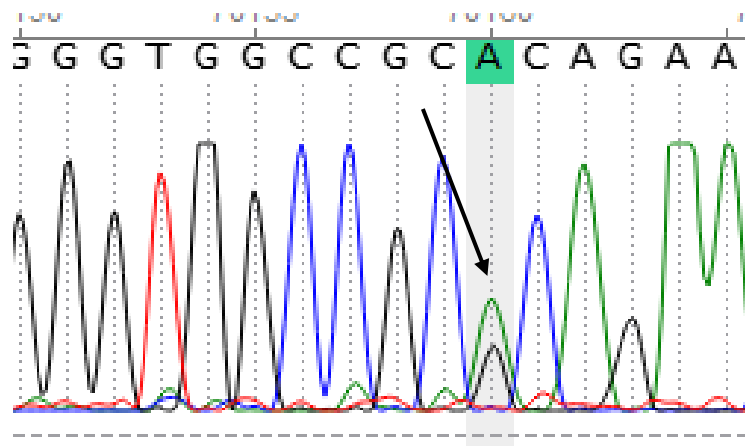


Рис. 3. 18. Хроматограма секвенування гена *ATP7B*, що містить перебудову с.3009G>A (GC[G/A]CA) у гетерозиготному стані. Стрілка вказує місце перебудови.

Цей варіант не веде до зміни послідовностей амінокислот у білку, і трактується у базах даних як однонуклеотидний поліморфізм rs1801247. На рис. 3. 19 наведено значення даного поліморфізму в базі Mutation t@ster.

Prediction polymorphism		Model: <i>w/mout_ase</i> , prob: 1.00301049482195e-14 (classification due to TGP/ExAC, real probability is shown anyway) (score)													
Summary	<ul style="list-style-type: none"> • homozygous in TGP or ExAC • protein features (might be) affected • splice site changes 	hyperlink													
analysed issue	analysis result														
name of alteration	no title														
alteration (phys. location)	chr13:52520471C>T show variant in all transcripts IGV														
HGNC symbol	ATP7B														
Ensembl transcript ID	ENST00000242839														
Genbank transcript ID	NM_000053														
UniProt peptide	E35670														
alteration type	single base exchange														
alteration region	CDS														
DNA changes	c.3009G>A cDNA.3166G>A g.65160G>A														
AA changes	no AA changes														
positions of affected AA EAA alteration in CDS	N/A														
frameshift	no														
known variant	Reference ID: rs1801247														
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>database</th> <th>homozygous (T/T)</th> <th>heterozygous</th> <th>allele carriers</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1000G</td> <td>5</td> <td>175</td> <td>180</td> </tr> <tr> <td>ExAC</td> <td>212</td> <td>5740</td> <td>5952</td> </tr> </tbody> </table>	database	homozygous (T/T)	heterozygous	allele carriers	1000G	5	175	180	ExAC	212	5740	5952		
database	homozygous (T/T)	heterozygous	allele carriers												
1000G	5	175	180												
ExAC	212	5740	5952												

Рис. 3. 19. значення поліморфізму rs1801247, наведене в базі Mutation t@ster.

В базі даних Clin Var даний поліморфізм описаний як синонімічна заміна, значення якої не однозначне. Результати пошуку в базі Clin Var наведено на рис. 3. 20.

13:52520465 G / A (rs74085888)	13	52520465	p.Asn798Asn	PASS	synonymous	123
13:52520471 C / T (rs1801247)	13	52520471	p.Ala796Ala	PASS	synonymous MNP	6164
13:52520472 G / A	13	52520472	p.Ala796Val	PASS	missense	7

Рис. 3. 20. Результати пошуку заміни rs1801247, наведена в базі ClinVar.

До недавнього часу в базі ExAc він трактувався як варіант невідомого значення, та був описаний один випадок детекції цього варіанту, а в on line ресурсі mutation t@ster як патогенний варіант.

Prediction		disease causing	M												
Summary		<ul style="list-style-type: none"> protein features (might be) affected splice site changes 	b												
analysed issue	analysis result														
name of alteration	no title														
alteration (phys. location)	chr13:52518245C>T show variant in all transcripts IGV														
HGNC symbol	ATP7B														
Ensembl transcript ID	ENST00000448424														
Genbank transcript ID	N/A														
UniProt peptide	P35670														
alteration type	single base exchange														
alteration region	CDS														
DNA changes	c.3009G>A cDNA:3083G>A g.67386G>A														
AA changes	no AA changes														
positivity of altered AA	N/A														
if AA alteration in CDS	no														
frameshift	no														
known variant	<table border="1"> <thead> <tr> <th>database</th> <th>homozygous (T/T)</th> <th>heterozygous</th> <th>allele carriers</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1000G</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>ExAC</td> <td>0</td> <td>1</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table>			database	homozygous (T/T)	heterozygous	allele carriers	1000G	-	-	-	ExAC	0	1	1
database	homozygous (T/T)	heterozygous	allele carriers												
1000G	-	-	-												
ExAC	0	1	1												
regulator features															

Рис. 3. 21. Прогноз клінічного значення алельного варіанту в базі Mutation tester.

Відповідно до отриманих результатів секвенування екзону 10 гена *ATP7B*, виявлено міссенс мутацію c.2495A>G в гетерозиготному стані у 6 пацієнтів, та в гомозиготному стані у двох осіб. Хроматограму секвенування 10 екзона гена *ATP7B* наведено на рис. 3.22. Ця перебудова зумовлює заміну лізину на аргінін в позиції 832 амінокислотної послідовності трансмембранного домену білка АТР7В (p.Lys832Arg). Проте, цей варіант в базах даних трактується як однонуклеотидний поліморфізм (rs1061478), клінічне значення якого залишається дискусійним. Є дані про те, що цей алель в гомозиготному стані порушує обмін міді та підвищує ризик розвитку хвороби Альцгеймера на 75% [105]. У дослідженні даний варіант виявлено у пацієнтів із клінічними проявами характерними для ХВ за відсутності інших патогенних мутацій. У п'ятох пацієнтів окрім варіанту c.2495A>G виявлено однонуклеотидні заміни в екзонах 3, 4 та 13.

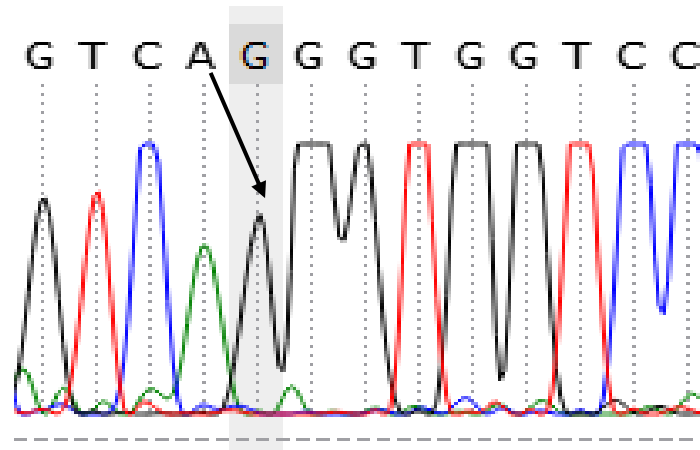


Рис. 3. 22. Хроматограма секвенування 13 екзона гена *ATP7B*, що містить SNP с.2495A>G CA[A/G]GG) у гомозиготному стані. Стрілка вказує місце перебудови.

В одному із зразків в послідовності 15 екзона гена *ATP7B* виявлено втрату одного нуклеотиду в позиції 3402 - мутацію с.3402delC. Ця перебудова зумовлює заміну аланіну на глутамін в позиції 1135 амінокислот АТФ-зв'язуючого домену білка АТР7В (р.Ala1135GlnfsX13). Мутація веде до зсуву рамки зчитування та описана в базі даних HGMD як патогенна (rs137853281). Ця перебудова виявлена в компаунд гетерозиготному стані з мажорною мутацією с.3207C>А у 17 річного хлопця з ідіопатичним гепатитом. Хроматограма секвенування 15-го екзону, що містить перебудову с. 3402delC представлено на рис. 3.23.

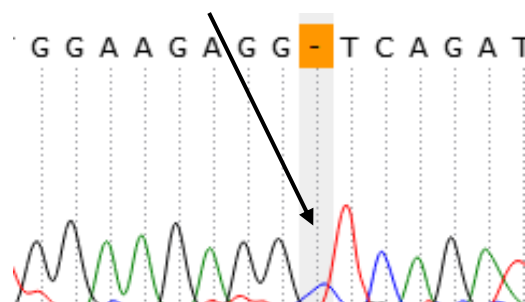


Рис. 3. 23. Хроматограма секвенування 15 екзону гена *ATP7B*, що містить мутацію с.3402delC. (AG[C/-]TC). Стрілка вказує на місце перебудови.

У результатів секвенування з 16 по 21 екзонів гена *ATP7B* в досліджуваних зразках ДНК пацієнтів, що набрали три та більше балів за діагностичною шкалою Лейпциг, відмінностей від референтної послідовності гена не виявлено. Аналіз даних літератури показав, що для європейської популяції мутації цих екзонів не є частими [4]. Також, не виявлено відмінностей від референтної послідовності у межах 1, 11 та 12 екзонів гена *ATP7B*. Секвенування екзону 2 проводили в три етапи, оскільки екзон складається з 1233 п.н., але жодних перебудов у ньому не виявлено.

Відповідно до баз даних мутацій гена *ATP7B*, рідкісними є мутації екзона 3. У даному дослідженні в межах екзона 3 гена *ATP7B* в чотирьох осіб виявлено однонуклеотидний поліморфізм с.1366C>G (AG[C/G]GT) rs1801244 - заміна амінокислоти валіну на лейцин в положенні 456 в гетерозиготному стані, у трьох - в гомозиготному стані (рис.3.24). В одного із пацієнтів виявлено однонуклеотидний поліморфізм с.1366C>T, (AG[C/T]GT) в гетерозиготному стані (рис. 3. 25)

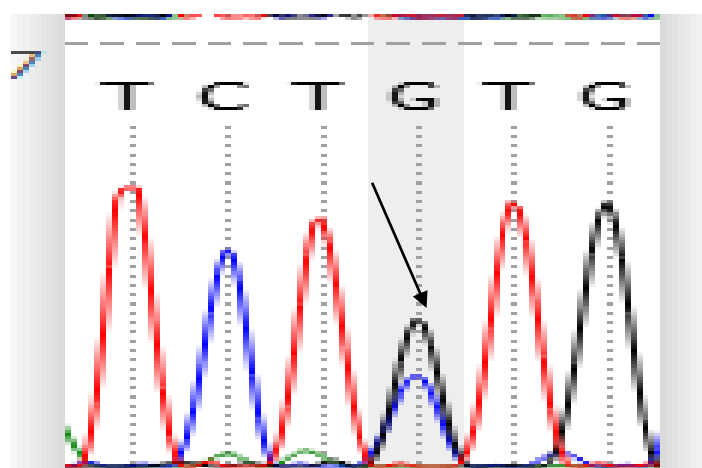


Рис. 3. 24. Хроматограма секвенування 13 екзона гена *ATP7B*, що містить SNP с.1366C>G (AG[C/G]GT). Стрілка вказує місце перебудови.

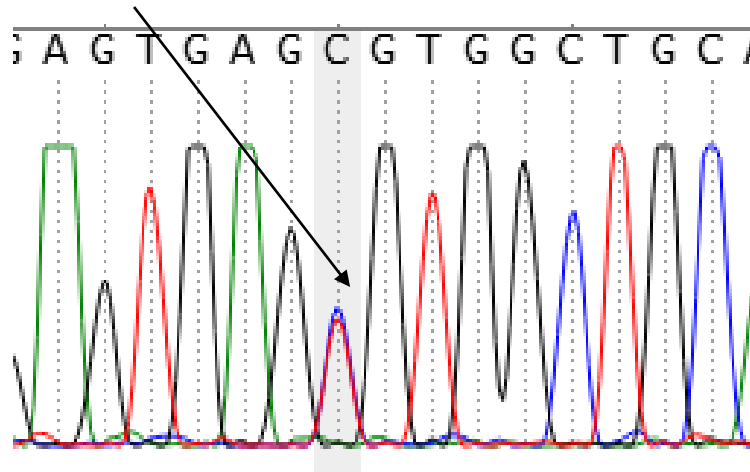


Рис. 3. 25. Хроматограма секвенування 13 екзона гена *ATP7B*, що містить SNP с.1366C>T (GAG[C/T]GT). Стрілки вказують місце перебудови.

У результаті секвенування екзона 4 виявлено заміну цитозину на тимін у положення 1551. Хроматограму детекції варіанту с.1551C>T наведено на рис. 3. 26.

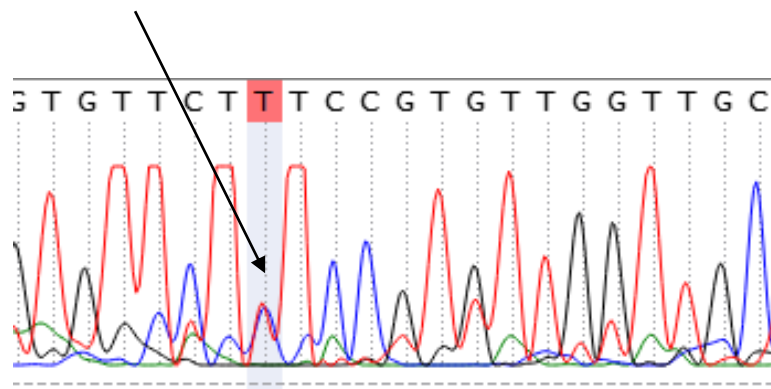


Рис. 3. 26. Хроматограма секвенування 13 екзона гена *ATP7B*, що містить SNP с.1551C>T (CT[C/T]TC). Стрілка вказує місце перебудови.

У доступних базах даних (NCBI, PubMed, Wilson disease data base) даний варіант не описаний. За результатами он лайн ресурсу Mutation Taster варіант вважається патогенним, хоча не спричиняє амінокислотної заміни. Сторінка інтернет ресурсу наведена на рис. 3. 27.

Prediction	disease causing	Model: without_aae, prob: 0.999957134118207
Summary	<ul style="list-style-type: none"> protein features (might be) affected splice site changes 	hyprotlink
analysed issue	analysis result	
name of alteration	no site	
alteration (phys. location)	chr13:52542736G-A show variant in all transcripts IGV	
HGNC symbol	ATP7B	
Ensembl transcript ID	ENST00000242839	
Genbank transcript ID	NM_000653	
UniProt peptide	P35570	
alteration type	single base exchange	
alteration region	CDS	
DNA changes	c.1551C>T cDNA: TTAGC>T g.42895C>T	
AA changes	no AA changes	
consistency of altered AA	yes	
frameshift	no	
known variant	Variant was neither found in ExAC nor 1000G. Search ExAC	
regulatory features	H3K36me3, Histone, Histone 3 Lysine 36 Tri-Methylation	
phyloP / phastCons	PhyloP PhastCons (flanking) 3.473 0.98 -0.793 0.002 (flanking) 1.599 0.005 view scores and/or inspect your position(s) in UCSC Genome Browser	

Рис.3. 27. Результат пошуку клінічного значення варіанту с.1551C>Т гена ATP7B. Сторінка Mutation Taster.

Даний зразок варто секвенувати повторно зворотньою парою праймерів для підтвердження результату, оскільки на секвенограмі в даній ділянці виявлено ймовірно інші заміни, які проявилися з низьким рівнем оптичного сигналу. Для подальшого з'ясування послідовності в цій ділянці та підтвердження результатів, необхідне проведення додаткового аналізу.

В межах четвертого екзону виявлено ще одну перебудову с.1671G>T, яка не описана в базі даних NCBI, PubMed, ExAc, 1000G. Хроматограму секвенування даного фрагменту наведено на рис. 3.28

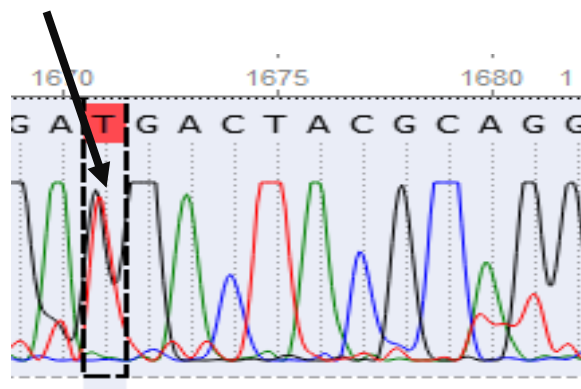


Рис. 3. 28. Хроматограма секвенування 13 екзона гена *ATP7B*, що містить SNP с.1671G>T (GA[G/T]GA). Стрілка вказує місце перебудови

За результатами он-лайн ресурсу Mutation t@ster варіант може спричиняти захворювання, хоча не спричиняє амінокислотної заміни на рівні білка. Результат пошуку наведено на рис. 3.29.

Prediction	disease causing	Model: <i>simple_aae</i> , prob: 0.99858832420349 (explain)
Summary	<ul style="list-style-type: none"> amino acid sequence changed protein features (might be) affected splice site changes 	hyperlink
analysed issue	analysis result	
name of alteration	no title	
alteration (hgvs location)	chr13:52542616C>A show variant in all transcripts IGV	
HGNC symbol	ATP7B	
Ensembl transcript ID	ENST00000242839	
Genbank transcript ID	NM_000053	
UniProt peptide	P35670	
alteration type	single base exchange	
alteration region	CDS	
DNA changes	c.1671G>T cDNA: 1828G>T g.43015G>T	
AA changes	E557D Score: 45 (explain score(s))	
position(s) of altered AA	557	
if AA alteration in CDS		
frameshift	no	
known variant	Variant was neither found in EXAC nor 1000G. Search ExAC	
regulatory features	H3K36me3, Histone, Histone 3 Lysine 36 Tri-Methylation	
dbVP / phastCons		

Рис.3. 29. Результат аналізу клінічного значення виявленого алельного варіанту c.1671G>T гена *ATP7B* з використанням он-лайн ресурсу Mutation Taster.

У роботі 6/23 пацієнтів, які набрали 3 та більше бали за шкалою Лейпциг, в екзонних послідовностях гена *ATP7B* виявлено наявність одонуклеотидних поліморфізмів при відсутності патогенних алелів. За останні кілька років поняття «синонімічні мутації» дуже змінилось. Синонімічні мутації, які колись вважалися нешкідливими, все частіше проявляються, як патогенні [24].

Відповідно до отриманих результатів виявили 5 різних мутацій та 6 одонуклеотидних поліморфізмів у гені *ATP7B* серед 23 пацієнтів з діагнозом хвороба Вільсона. Результати генетичного тестування мажорної мутації c.3207C>A та секвенування екзонів гена *ATP7B* у групі осіб з клінічними проявами ХВ наведено в таблиці 3.8.

Таблиця 3.8.

Результати генетичного тестування мажорної мутації с.3207С>А та секвенування екзонів гена *ATP7B* у групі осіб із хворобою Вільсона

№ пп	Алельний варіант гена <i>ATP7B</i>	Трактування відповідно до рекомендацій АСМГ (2011) [3]	Но- мер екзо на	Кількість виявлених випадків		
				У гомози- готному стані	У гетеро- зиготн ому стані	У компаунд гетерози- готному стані
1	с.3207С>А	Патогенний	14	15	7	6
2	с.2304dupС	Патогенний	8	-	1	3
3	с.2128G>А	Патогенний	8	-	-	1
4	с.3402delС	Патогенний	15	-	1	1
5	с.3011А>С	Патогенний	13	-	-	1
6	с.3009G>А	Нейтральний поліморфізм	13	-	-	2
7	с.2495А>G	Ймовірно доброякісний (алель ризик розвитку хвороби Альцгеймера)	10	2	2	4
8	с.1366С>G	Нейтральний поліморфізм	3	3	-	5
9	с.1366С>Т	Варіант невизначеного значення (не описано)	3	-	1	-
10	с.2973G>А	Нейтральний поліморфізм	13	1	-	2
11	с.1551С>Т	Варіант невизначеного значення (не описано)	4	-	1	-
12	с.1671G>Т	Варіант невизначеного значення (не описано)	4	-	1	-
13	с.3191А>С	Патогенний	14	-	1	-

Дані, наведені в таблиці 3.12. свідчать про широкий спектр алельних варіантів гена *ATP7B*. Трактування та прогнозування клінічного значення проводили відповідно до рекомендацій АСМГ. В нашій групі виявлено виявлено 5 нейтральних варіантів в гомо- чи гетерозиготному стані. Деякі з них призводять до синонімічних замінів білка (с.3009G>А), інших трактується як нейтральний поліморфізм. Бази даних продовжують поповнюватись новими

мутаціями. Частоти патогенних алелів гена *ATP7B* у групі осіб із клінічними проявами ХВ з України приведено у таблиці 3.9.

Таблиця 3.9.

Частота патогенних варіантів гена *ATP7B* у групі осіб з клінічними проявами хвороби Вільсона з України

№	Алелі гена <i>ATP7B</i>	Частота алеля, n (%)	
		серед генетично верифікованих випадків хвороби Вільсона	серед усіх обстежених з підозрою хвороби Вільсона,
1	c.3207C>A	38 (82,6)	43 (22,4)
2	c.2304dupC	2 (4,3)	4 (2,1)
3	c.3402delC	2 (4,3)	2 (1,0)
4	c.2128G>A	1 (2,2)	1 (0,5)
5	c.3011A>C	1 (2,2)	1 (0,5)
6	c.2827G>A	1 (2,2)	1 (0,5)
7	c.3191A>C	1 (2,2)	1 (0,5)
	Всього алелів	46	192

Як свідчать дані, наведені в таблицях 3.11 та 3.12 найпоширенішу для європейців мутацію (c.3207C>A) виявили у 28 пацієнтів, включаючи 15 випадків гомозиготності. У 8 осіб мутація c.3207C>A була у компаунд гетерозиготному стані з іншими мутаціями гена *ATP7B* : 3 – c.2304dupC (8 екзон), одна - c.2128G> A (8 екзон), одна - c.3011A>C (13 екзон), одна - c.3402delC (15 екзон), одна c.2827G>A. У 7 осіб окрім мутації H1069Q інших перебудов виявлено не було. Частота алелю c.3207C>A серед генетично верифікованих випадків становить 82,6%. Частота алелю c.2304dupC серед генетично верифікованих випадків становить 7%, що є вищою, ніж в інших популяціях.

Особи з ознаками захворювання, яким вдалось генетично підтвердити діагноз хвороба Вільсона, були вихідцями з Львівської, Чернівецької, Дніпропетровської, Донецької областей (рис. 3. 30).



Рис. 3. 30. Територіальний розподіл пацієнтів з України з генетично підтвердженим діагнозом хвороба Вільсона.

Крім того, слід додати, що робота не включала дослідження інтронних послідовностей, які теж можуть містити патогенні варіанти. Варто зазначити, що можливо не у всіх пацієнтів, які увійшли в дослідну групу, порушення зумовлені саме хворобою Вільсона. Через значний поліморфізм симптомів дуже важко відрізнити неврологічні порушення, спричинені хворобою Вільсона, від неврологічних захворювань іншої етіології. Слід також відзначити, що збільшений рівень міді може виявлятися при гепатитах іншого генезу, окрім ХВ, що утруднює коректний клінічний відбір групи пацієнтів із ХВ. Не є частою ознакою й наявність кільця Кайзера, яке розвивається переважно на пізніх стадіях хвороби. Усі ці обмеження мають значення для отримання показника частот мутантних алелів у пацієнтів з України. Частота в Європі патогенного алелю с.3207C>A (H1069Q) гена *ATP7B* серед пацієнтів з

ідіопатичними гепатобіліарними порушеннями становить лише 24%. У осіб з клінічними ознаками хвороби Вільсона, тобто тих, які набрали 3 та більше балів відповідно до бальної системи діагностичних тестів – у 43/56 (частота алелю 82.6%). Серед генетично верифікованих випадків частота мажорної мутації с.3207C>A (H1069Q) гена *ATP7B* сягає 88%, що вказує на її високу інформативність для застосування в практичній діагностиці та медико-генетичному тестуванні.

Результати даного підрозділу представлено в наступних публікаціях:

1. Н. Makukh, I. Hayboniuk, A. Zarina, O. M. Semeriak & L. Gailite Mutations in the *ATP7B* Gene in Ukrainian Patients with High Risk of Wilson's Disease, *Cytol Genet.*, 2020, vol. 54, no. 4, pp. 324–332

3.4 Ефективність впровадження в практику генетичного тестування мутацій с.3207C>A та с.2304dupC гена *ATP7B* серед осіб із підозрою хвороби Вільсона.

За результатами досліджень для практичної діагностики в умовах лабораторії генетичних досліджень ДУ «ІСП НАМНУ» впроваджено генетичне тестування мутації с.3207C>A методом PCR BI-PASA в дублях з використанням двох різних наборів праймерів (по чотири праймери в кожній реакції). При відсутності цієї мажорної мутації, або при її наявності в гетерозиготному стані, проводиться аналіз мутацій в межах екзона 8 гена *ATP7B*. Для аналізу екзону 8 та 14 апробована методика HRM аналізу, яка досягнула відтворюваності між різними експериментами при наявності різних алелів. Підібрано праймери та розроблено методику тестування двох частин для жителів України мутацій у екзоні 8 гена *ATP7B* методом ПДРФ та HRM.

Оскільки, мутація с.2304dupC виявлена в чотирьох пацієнтів з дослідженої вибірки, вважаємо її частою для жителів України. В практику

впроваджено генетичне тестування мутації c.2304dupC для покращення діагностики хвороби Вільсона методом поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів. Використовуючи онлайн-ресурс primer design 3, підібрано праймери (forward 5'-GTCACGACTGTGCACAAAGC-3', reverse -5' TTCTGAACCTGAAGCTGCTGT -3') для ампліфікації фрагменту 8 екзона гена *ATP7B* величиною 285 пар нуклеотидів.

З часу впровадження в практику генетичного тестування переважаючої для нашої популяції мутації c.3207C>A гена *ATP7B* генетично верифіковано діагноз у 17/56 пацієнтів, що становить 30,4%, включаючи 15 випадків гомозиготності. Усі Особи з ознаками захворювання звертались з вираженими симптомами захворювання, а саме зі змінами рівня трансаміназ, криптогенним гепатитом, цирозом, сильним тремором, порушенням ходи, депресією та неконтрольованою агресією. Лише в одній особі підтвердили присутність кільця Кайзера-Фрейшера на десцеметовій мембрані рогівки, хоча перші прояви були зі сторони печінки, які передували неврологічним на 5 років. Без відсутності правильного лікування захворювання прогресувало та призвело до серйозних неврологічних порушень та погіршення функціонального стану печінки. У чотирьох осіб з п'яти з неврологічними проявами кільце Кайзера-Флейшера не виявлено, що вказує на те, що цей критерій не є як вважалося високоінформативним для діагностики хвороби Вільсона.

Серед усіх випадків, які були верифіковані в ДУ «Інститут спадкової патології НАМНУ» менше третини діагностовано в дитячому віці. Зважаючи на важливість вчасної діагностики даного захворювання прояви в дитячому віці мають викликати особливу настороженість у лікарів. Саме тому нами проведено генетичне тестування мутацій гена *ATP7B* серед дітей з аутоімунним криптогенним гепатитом.

Згідно отриманих результатів, ХВ маніфестує у молодшому шкільному віці (6–7 років), однак прояви неспецифічні і стосуються ураження гепатобіліарної системи нез'ясованого генезу. За трьохрічний період, хворобу Вільсона у дитячому віці підтверджено у 9 осіб із 25, у яких була підозра на це

захворювання, й переважно у другій декаді життя. Троє дітей мали вік менше 10 років. Ці дані свідчать про необхідність підвищення настороженості щодо діагностики ХВ серед педіатрів.

У дев'яти (п'яти хлопців та чотирьох дівчат) з 25 дітей виявлено мутації гена *ATP7B* в гомо- чи гетерозиготному стані. За результатами молекулярно-генетичного аналізу, найбільш поширений в Європі патогенний варіант гена *ATP7B* p.His1069Q (на рівні кДНК с. 3207C>A) був підтверджений у 9 пацієнтів дитячого віку, включаючи 4 випадки мутації в гомозиготному стані. В одному випадку мутацію H1069Q виявлено з іншим алельним варіантом гена *ATP7B*. Результати визначення мутацій гена *ATP7B* серед пацієнтів дитячого віку, у яких запідозрена хвороба Вільсона наведено в табл. 3.10.

Таблиця 3.10

Зв'язок генотипу, фенотипу й біохімічних показників у дітей з генетично підтвердженим діагнозом хвороба Вільсона

Номер зразка	Генотип	Стать	Вік на час діагностики	Неврологічні прояви	Ураження гепатобілярної с-ми	Біохімічні показники
1	с. 3207C>A/ с2304dup C	ч	10	Відсутні	Цироз печінки	Церулопламін 0,1г/л (норма:0,2–0,6г/л),мідь в крові 33мкг/дл (норма: 80–160 мкг/л).Мідь в сечі – 961 мг/добу, АСТ – 70 МО/л, АЛТ – 164 МО/л, білірубін 12,4мкМоль/л
2	с. 3207C>A/ 3207C>A	ч	17	Відсутні	Автоімунний гепатит	
3	с. 3207C>A / 3207C>A	ж	14	Відсутні	Автоімунний гепатит	
4	с. 3207C>A/ X	ч	12	Відсутні	Фульмінантний гепатит	
5	с. 3207C>A/ X	ж	14	Відсутні	Цироз печінки	Мідь в сечі 1025мг/добу, церулоплазмін 0,12г/л, АЛТ –64 МО/л, АСТ – 115 МО/л, білірубін 25,8 мкМоль/л
6	с. 3207C>A/ 3207C>A	ч	6	Відсутні	Автоімунний гепатит	
7	с. 3207C>A/ X	ч	6	Відсутні	Автоімунний гепатит	
8	с. 3207C>A/ 3207C>A	ж	7	Відсутні	Хронічний гепатит	Мідь в сечі 175 мг/добу, церулоплазмін 0,14 г/л, АЛТ – 118 МО/л,

						АСТ – 88 МО/л, білірубін 7,5 мкМоль/л
9	c.3402del C/X	ж	13	Відсутні	Цироз печінки/гем олітична анемія	Мідь в сечі 1700мг/добу, церулоплазмінменьше 0,03г/л, АЛТ – 86МО/л, АСТ – 112 МО/л, білірубін 53мкМоль/л
10	X\X	ч	16	Вогнищев і зміни у мості головного мозку	Цироз печінки	Мідь в сечі 227мкг/добу, АЛТ – 1745мо/л, АСТ – 873мо/л, білірубін 314 мкМоль/л
11	c.3191A> C/x	ч	3	Відсутні	Автоімунни й гепатит	

У половині генетично підтверджених випадків ХВ клінічним діагнозом був автоімунний гепатит, що, як припускаємо, вказувало тільки на виключення інших відомих чинників гепатобіліарних порушень, а не на наявність імунних реакцій. Отримані результати вказують на те, що в дитячому віці випадки хвороби Вільсона можуть перебувати на лікуванні з іншими діагнозами, (а саме – автоімунний гепатит), якщо лікар немає настороженості щодо ХВ та не скерує на відповідне обстеження.

Необхідно звернути увагу, що серед дітей, яким діагностовано ХВ, навіть підліткового віку, за винятком одного випадку, відсутні прояви з боку нервової системи. У жодного із пацієнтів у дитячому віці не спостерігали кільця Кайзера-Флейшера на мембрані рогівки. Тому при виявленні порушень обміну міді, як референтний, огляд окуліста – є не обов'язковим.

Серед пацієнтів з України, які набрали три та більше балів відповідно до бальної системи діагностичних тестів хвороби Вільсона, частота мажорної мутації c.3207C>A (H1069Q) гена *ATP7B* складає 82,6%. Другим найбільш частим варіантом для пацієнтів із України є c.2304dupC, який складає 6,5% алелів генетично верифікованих випадків. Отримані показники вказують на доцільність застосування в практичній діагностиці та медико-генетичному тестуванні визначення саме цих мутацій. Слід вказати й на короткий час

проведення аналізу й не високу собівартість запропонованих в роботі методів діагностики. Отримані результати вказують на високу інформативність генетичного тестування мутацій с.3207C>A та с.2304dupC гена *ATP7B* серед осіб з хворобою Вільсона з України. Базуючись на встановленому в роботі показнику гетерозиготного носійства мутації с.3207C>A серед мешканців західних областей України (1 на 57) та частці цього алелю серед пацієнтів з хворобою Вільсона (82,6%), частота гетерозиготного носійства різних мутантних алелів гена *ATP7B* сягає 1 : 43, а передбачувана цього моногенного захворювання - 1 : 13061 жителів України.

На основі встановленого внеску варіантів генів *ATP7B*, *UGT1A1* *HFE* в етіологію ідіопатичних гепатобіліарних порушень запропонували алгоритм генетичної діагностики (рис.3.31).

Алгоритм генетичної діагностики у випадках ідіопатичних гепатобіліарних порушень в осіб молодого віку



Рис.3.31. Алгоритм генетичної діагностики при ідіопатичних гепатобіліарних порушеннях.

Представлений алгоритм пропонується для використання фахівцями, які проводять диференційну діагностику серед пацієнтів з ідіопатичними гепатобіліарними порушеннями, особливо в молодому віці.

Результати даного підрозділу представлено в наступних публікаціях:

2. I. Haiboniuk, M. Dats-Opoka, H. Makukh, Ya. Wojko, I. Kiselyk. Genetic diagnostics and clinical features of Wilson's disease in children. *EUREKA. Life sciences*. 2020. Vol.2. P. 3-9.

3. Ivanna Haiboniuk, Nataliya Kitsera, Zoriana Osadchuk, Bogdan Tretyak, Halyna Makukh. Frequency of the HFE gene mutation C282Y and H63D in patients with hepatobiliary disease from Lviv region. *J Sci Discov*. 2021. 5(2): jsd21005.

УЗАГАЛЬНЕННЯ

Широкі можливості сучасних генетичних технологій змінили парадигму в підходах до діагностики та лікування більшості хвороб людини (порушень). Знання про первинну структуру ДНК, функціонування відповідних білкових продуктів, є визначальними для розробки механізмів їх корекції.

Гепатобіліарна система зазнає великого навантаження протягом життя, оскільки задіяна в метаболізмі практично всіх речовин, які потрапляють в організм. За даними ВООЗ близько 30% усього населення світу страждає на порушення печінки [144]. Дуже часто спосіб життя, інфікування вірусними агентами, присутність паразитів, токсичний вплив препаратів чи генетичні чинники завдають серйозного ушкодження органом гепатобіліарної системи, що може спричинити потребу трансплантації печінки. Зазвичай, процес такого серйозного ураження не відбувається одномоментно. Дуже часто є симптоми, які інформують про порушення функціонування органу, на які Особи з ознаками захворювання не звертають увагу. Тому, коли з'являються виражені симптоми дуже важливо якнайшвидше встановити причину таких порушень, оскільки це свідчить про те, що ураження прогресує та вже завдало серйозних ушкоджень. На етапі діагностики, коли виключено присутність вірусних гепатитів, паразитарних захворювань, медикаментозне ушкодження, алкогольної інтоксикації, потрібно виключити ймовірні генетичні чинники таких порушень. Моногенних генетичних захворювань, які супроводжуються ураженнями гепатобіліарної системи, є багато. Серед них такі, як: спадковий гемохроматоз, хвороба Вільсона, дефіцит альфа 1 антитрипсину, синдром Кригера-Найяра, синдром Жильбера, муковісцидоз тощо. Тестування на усі згадані вище захворювання є довготривалим та дорогим. Тому, дуже важливо встановити, які саме з них найчастіше спричиняють гепатобіліарні порушення у нашій популяції. Тому, першим етапом роботи було встановлення поширеності найчастіших генетичних чинників таких порушень, а саме мутацій

канів-кандидатів ідіопатичних гепатобіліарних порушень (*HFE*, *ATP7B*, *UGT1A1*).

На сьогодні дані про поширеність хвороби Вільсона в різних регіонах світу коливається в широких межах: від 1:30 000 до 1:200 000 [102]. Опубліковано дані, що частота цього захворювання в 25 разів вища, ніж вважається, і знаходиться в межах 1:7000 [52]. Щодо України, то дані практично відсутні, за винятком опису одиничних випадків захворювання в різних регіонах. У результаті проведених досліджень нами встановлено частоту гетерозиготного носійства на рівні 1:43, що є значно вище, ніж описано в інших популяціях, і таким ж високим, як серед жителів Франції (1:31) та Британії (1:25) [19], зважаючи на те, що їх розрахунки базуються на повноекзомному секвенуванні гена *ATP7B*.

У результаті нашої роботи, серед вибірки практично здорових осіб не було виявлено жодного гомозиготного генотипу за мутацією с.3207C>A гена *ATP7B*. Це може пов'язано з повною пенетрантністю мутації с.3207C>A в гомозиготному стані, а також вказує, що підібрана контрольна група відображає реальну частоту гетерозиготних носіїв, оскільки середній вік маніфестації захворювання 20-30 років, а середній вік осіб дослідної групи 35 років, тобто старше віку маніфестації. Щодо розподілу мутації між особами жіночої та чоловічої статі, то значущої відмінності не виявлено.

Розрахована на основі отриманих даних, теоретична поширеність хвороби Вільсона в Україні становить 1:13061, що в два рази вище даних літератури [144]. Ці дані важливі для планування заходів в системі охорони здоров'я України. Отримані дані можуть вказувати на низьку настороженість лікарів щодо частоти даної нозології, і відповідно її гіподіагностику. Висока частота гетерозиготних носіїв мутації с.3207C>A вказує на доцільність її тестування серед осіб високого ризику розвитку хвороби Вільсона з України, беручи до уваги наявність ефективної специфічної терапії.

Крім хвороби Вільсона частим захворюванням, яке спричиняє порушення гепатобіліарної системи, і має ефективне патогенетичне лікування, є спадковий

гемохроматоз. Частота знаходиться в межах 1:500 [45]. Серед 280 обстежених виявлено 7 носіїв мутації $c.845G> A$ в гетерозиготному стані. У жодної особи не було виявлено даного варіанту в гомозиготному стані. Мутацію $c.187C>G$ гена *HFE* виявляли значно частіше, ніж варіант $c.845G> A$, а саме у 75 осіб в гетерозиготному стані, у 3-х осіб в гомозиготному стані. Можливо це пов'язано з низькою пенетрантністю варіанту і підтверджує літературні дані стосовно трактувань цього варіанту, як нейтрального поліморфізму.

Отримані результати вказують на високу частоту варіанту $c.187C> G$ в досліджуваній вибірці, що становить 27,9%. Дані результати співпадають з результатами, отриманими в інших країнах, зокрема в Польщі, де частота цього варіанту становить 25%. [58], а серед жителів Франції – 27% [89]. Цей варіант класифіковано як низькопенетрантний алель гена *HFE*.

Встановлено частоту гетерозиготного носійства мутації $c.845G> A$ гена *HFE* у загальній вибірці мешканців західних областей України на рівні 1,3%. Виявлена у роботі частота мутації $c.845G> A$ гена *HFE* є подібною до частоти в інших популяціях та етнічних групах. Зокрема для жителів Європейських країн частота цієї мутації знаходиться в межах 1,3-8,2% [101]. Серед жителів Литви частота цього алелю становить 2, 8% [109], Франції - 1,5% [89].

Встановлено популяційну частоту алелю $A(TA)_7TAA$ гена *UGT1A1*, який асоціюється з синдромом Жильбера (гіпербілірубінемія) серед практично здорових жителів України.

У результаті проведеного дослідження серед мешканців західних областей України алель дикого типу в гомозиготному стані виявили у 82 осіб серед 196 обстежених. У 23 осіб виявлено низькофункціональну алель в гомозиготному стані та 91 особа були гетерозиготами. Частота алелю ризику $A(TA)_7TAA$ становить 35,0%, частота алелю дикого типу становить 65,0%. Отримані частоти генотипів відповідають рівновазі Харді-Вайнберга.

Аналіз відповідності фактичних частот генотипів теоретично очікуваним в обох популяційних вибірках свідчить про випадковий розподіл генотипів у відповідності з розподілом Харді-Вайнберга ($p>0.05$). Проведений

порівняльний аналіз алельного поліморфізму локусу *UGT1A1* (rs8175347) не виявив вірогідної різниці в розподілі частот алелів та генотипів цього локусу у пацієнтів чоловічої та жіночої статі.

Частота алелю-ризик А(ТА)₇ТАА в нашій популяції становить 35,0%, що нижче, ніж у Румунії (43,6% із 605 обстежених осіб), у Польщі (41,2% із 78 обстежених), Сербії (40,3% із 100 обстежених) та інших країнах, але вище, ніж серед африканських країн, для яких частота мутантного алелю становить 31%. Це може пояснюватись тим, що для їхньої популяції характерні інші алельні варіанти цього гена, в тому числі А(ТА)₅ТАА та А(ТА)₈ТАА [16].

Частота алелю А(ТА)₇ТАА в гомозиготному стані, який асоціюється з розвитком синдрому Жильбера серед вибірки практично здорових мешканців західних областей України, становить 12,2%.

Встановлено інформативну цінність даних досліджень серед осіб з ідіопатичними гепатобіліарними порушеннями. Зважаючи на високу популяційну частоту низькофункціонального алелю А(ТА)₇ТАА гена *UGT1A1* (35,0%) обстеження дослідної групи почали саме з генотипування цього алелю.

Генетичне тестування алелю А(ТА)₇ТАА гена *UGT1A1* серед осіб з ідіопатичними гепатобіліарними порушеннями дозволює встановити його частоту, яка становить 9,3% (4/43), не зважаючи на встановлену високу частоту алелю А(ТА)₇ТАА в популяції (35,0% - 165/488). Отримані результати генотипування алелю А(ТА)₇ТАА в дослідній групі відповідають популяційній частоті цього генотипу, що вказує на низьку інформативність даного дослідження в нашій вибірці.

Зважаючи на високу частоту захворювання, проведено генетичне тестування мутацій с.845G> А та с.187С> G гена *HFE* серед осіб з ідіопатичними гепатобіліарними порушеннями. Лише в однієї жінки діагноз вдалось підтвердити, оскільки у неї виявили мутацію с.187С> G в гомозиготному стані. Серед осіб жіночої статі з високою частотою виявляли мутацію с.187С>G в гетерозиготному стані (72,7%). Зі 172 обстежених діагноз

підтверджено у 5,8% осіб, не зважаючи на високу частоту гетерозиготних носіїв цих варіантів в популяції.

Встановлено частоти мажорної мутації с.3207C>A гена *ATP7B* серед вибірки осіб з ідіопатичними гепатобіліарними порушеннями. Генотипування проводили методом двонаправленої ампліфікації специфічних алелей (PCR *Bi-PASA*).

З 96 пацієнтів з гепатобіліарними порушеннями нез'ясованого генезу, які були обстежені на носійство найпоширеніших спадкових генетичних чинників, лише ¼ частина (23 особи) увійшли в групу високого ризику хвороби Вільсона, тобто набрали 3 та більше балів за бальною шкалою діагностичних тестів. Базуючись на результатах генетичного аналізу та наявних клінічних проявів було відібрано групу пацієнтів для наступного етапу – секвенування екзонів гена *ATP7B*.

У чотирьох пацієнтів виявлено однакову перебудову – p.Glu770Argfs. У трьох з них мутація була в компаунд гетерозиготному стані з мажорною мутацією с.3207C>A, що вказує на хворобу Вільсона. В однієї пацієнтки після секвенування усєї послідовності гена та детекції великих делецій та дуплікацій (MLPA) виявлено лише мутацію с.2304dupC. Оскільки, мутація с.2304dupC виявлена в чотирьох пацієнтів з дослідної групи маємо підстави вважати її частою для жителів України. В одного пацієнта виявлено мутацію с.2128G>A в межах екзону 8. Мутація описана в базі даних HGMD як патогенна (rs137853285). Серед дослідної групи у п'ятьох осіб перебудови були у 8 екзоні, що співпадає з даними літератури. Зокрема для жителів Європейських країн - Франції, Латвій, Австрії, Німеччини, характерні мутації в цьому екзоні [4]. За результатами секвенування та порівняння з референтною послідовністю, в екзоні 9 гена не виявлено перебудов у жодному із зразків ДНК. Секвенування цієї ділянки гена не є інформативне для досліджуваної популяції. У межах екзона 13 виявлено заміну аденіну на цитозин в положенні 3011 (с.3011A>C). У двох осіб в межах екзона 13 виявлено заміну аденіну на цитозин в положенні 2973 кДНК (с.2973A>C). Цей варіант не веде до зміни послідовностей

амінокислот у білку і трактується у базах даних як однонуклеотидний поліморфізм rs1801248. У дослідженій вибірці ця однонуклеотидна заміна виявлена у двох пацієнтів в гетерозиготному стані та в одного - в гомозиготному. Також, виявлено двох осіб із заміною гуаніну на аденін в положенні 3009 гена *ATP7B* (с.3009G>A) в гетерозиготному стані (rs1801247). В межах езону 13 виявлено три варіанти, хоча за даними літератури в цьому екзоні характерні перебудови для мешканців африканських країн. Для них частота мутацій в цьому екзоні становить 40,6% [4]. У двох осіб в межах ексона 15 виявлено мутацію с.3402delC. За даними літератури мутації цього ексона характерні для жителів Польщі, Німеччини, Африки, Бразилії [4].

Відповідно до отриманих результатів секвенування ексона 10 гена *ATP7B*, виявлено міссенс мутацію с.2495A>G в гетерозиготному стані у 6 пацієнтів, та в гомозиготному стані у двох осіб. Даний варіант виявлено у пацієнтів з клінічними проявами, характерними для ХВ, за відсутності інших патогенних мутацій. У п'яťох пацієнтів, крім варіанту с.2495A>G, виявлено однонуклеотидні заміни в екзонах 3, 4 та 13. Жодних інших перебудов у межах ексона 10 виявлено не було, хоча для жителів Угорщини мутації цього ексона виявляються у 12% випадків [19].

У результатів секвенування з 16 по 21 екзонів гена *ATP7B* в досліджуваних зразках ДНК пацієнтів, що набрали три та більше балів за діагностичною шкалою Лейпциг, відмінностей від референтної послідовності гена не виявлено. Аналіз даних літератури показав, що для європейської популяції мутації в цих екзонах не є частими [4]. Мутації ексона 18 характерні для жителів Коста Ріки (62% випадків), США (3,8%) та Африки (42%). Мутації ексона 20 виявляють у 3,7% осіб із Польщі. Не виявлено відмінностей від референтної послідовності у межах екзонів 1, 2, 11 та 12 гена *ATP7B*. В межах ексона 3 гена *ATP7B* в чотирьох осіб виявлено однонуклеотидний поліморфізм с.1366C>G (AG[C/T]GT) rs1801244 - заміну амінокислоти валіну на лейцин в положенні 456 в гетерозиготному стані, у трьох - в гомозиготному стані. Також виявлено варіант в 4 екзоні с.1551C>T, який на сьогодні не описаний. У

результаті роботи не встановлено перебудов у екзонах 5, 6 та 7, хоча за даними літератури мутації 6 екзону виявляються у 27% мешканців Іспанії [4].

Отримані результати секвенування вказують на те, що окрім переважаючої мутації с.3207C>A гена *ATP7B* серед даної вибірки осіб ідентифіковано чотири інші патогенні варіанти, що виявлялись у екзонах 8, 13 та 15, які можуть бути частими для жителів України. У третини пацієнтів при відсутності патогенних алелів в екзонних послідовностях гена *ATP7B* виявлено наявність одного чи декількох одонуклеотидних поліморфізмів. Серед них декілька не патогенних варіантів та один поліморфізм, асоційований з підвищенням ризику розвитку хвороби Альцгеймера (с.2495A>G). З огляду на вище зазначені дані, впровадження в практику виявлених поширених варіантів гена *ATP7B* дозволить скоротити час та підвищити ефективність проведення лабораторного обстеження для верифікації діагнозу та призначення специфічної терапії.

Аналізуючи публікації бази даних PubMed і мутацій хвороби Вільсона [36], спостерігаємо цікаву картину спектра мутацій гена *ATP7B* серед осіб із цим діагнозом у світі та Європі [19]. Щодо країн Європи, то результати досліджень показують одну переважаючу мутацію (H1069Q), яку виявляють найчастіше серед осіб із діагнозом хвороба Вільсона, але також є свої специфічні мутації. Зокрема, для польської популяції характерний наступний спектр мутацій: у 72 % із 42 обстежених осіб із клінічними чи біохімічними ознаками хвороби Вільсона виявляють мутацію H1069Q (екзон 14), у 7,3% осіб A1135Q (екзон 15), а у 3,7 % – G1351*(екзон 20) [39]. Ці мутації локалізовані в ділянці АТФ-зв'язуючого домену, що викликає порушення активного транспорту: мідь зв'язується, але не виводиться з клітини, тому в крові спостерігається високий рівень апоцерулоплазміну – попередника церулоплазміну, і дуже низький (близько 0) церулоплазміну. Це пояснюється тим, що для перетворення апоцерулоплазміну на церулоплазмін білок має зв'язатися з двовалентною міддю. Низький рівень даного білка вказує на порушення функціонування екскреторної системи цього елемента [88]. Для

пацієнтів із латвійської популяції теж переважаючою мутацією є H1069Q, яку виявляють у 70 % випадків (85 обстежених). Мутацію p.M769fs виявлено у 3,7 % осіб, інші мутації - c.3800A>G (p.Asp1267Gly), c.3971A>C (p.Asn1324Thr) виявляють у поодиноких сім'ях [112]. Ці мутантні варіанти теж локалізовані в ділянках, що кодують АТФ-зв'язуючий домен. Для австрійської популяції серед 16 обстежених причиною захворювання у 34,1 % є мутація H1069Q, у 6,4 % – G710S, у 3,6 % – M769fs. Мутації G710S та M769fs локалізовані в ділянці гена, що кодує трансмембранні домени білка (6-13 екзон) [24]. Серед жителів Німеччини у 52 % виявляють мутацію H1069Q, у 6,9 % - 3400delC та у 6,5 % осіб причиною захворювання є інші мутації екзона 8 [67]. Мутація 3400delC локалізована в екзоні 15, який відповідає за синтез АТФ-зв'язуючого домену. У західній частині Росії серед осіб із ознаками захворювання у 47,8 % причиною теж є мутація H1069Q [113]. Варто зазначити, що частота цієї мутації знижується серед жителів центральних і східних регіонів. У них формується свій специфічний спектр мутацій, які локалізуються переважно в екзоні 8. Дані досліджень сусідніх країн підтвердили, що H1069Q є переважаючою мутацією, яка спричиняє хворобу Вільсона. Окрім неї є великий спектр інших мутацій цього гена, для яких встановлена роль у розвитку захворювання. Дану тенденцію підтверджено нашими дослідженнями.

Також варто звернути увагу на те, що у 6/23 пацієнтів, які набрали 3 та більше бали за шкалою Лейпциг, в екзонних послідовностях гена *ATP7B* виявлено наявність однонуклеотидних поліморфізмів при відсутності патогенних алелів. За останні кілька років поняття «синонімічні мутації» дуже змінилось. Дослідження молекулярної еволюції показали, що у всіх організмах синонімічні кодони перебувають під тиском селекції. Ці спостереження були доповнені біохімічними, біофізичними та генетичними дослідженнями, які дають механістичні пояснення того, як таке зміщення кодону впливає на механізми транскрипції та контролю експресії генів, ефективності укладання білка та узгодженої експресії функціонально пов'язаних генів [30]. Інтерес до цього явища посилюється зв'язком між багатьма синонімічними мутаціями та

хворобами людини. Таким чином, синонімічні мутації, які колись вважалися не шкідливими, все частіше проявляються, як патогенні.

Варто звернути увагу на те, що лише у 7% осіб з генетично верифікованим діагнозом було присутнє кільце Кайзера-Флейшера, попри те, що за даними літератури його мають виявляти у 50% осіб з печінковими проявами, та у 98% з неврологічними проявами захворювання[74].

За результатами досліджень для практичної діагностики в умовах лабораторії генетичних досліджень ДУ «ІСП НАМНУ» впроваджено генетичне тестування мутації с.3207C>A із використання методу PCR BI-PASA в дублях зі застосуванням двох різних наборів праймерів по чотири праймери в кожній реакції. При відсутності цієї мажорної мутації, або при її наявності в гетерозиготному стані, проводиться аналіз мутацій в межах екзона 8 гена *ATP7B*. Для аналізу екзонів 8 та 14 апробована методика HRM аналізу, яка досягнула відтворюваності між різними експериментами при наявності різних алелів. Підібрано праймери та розроблено методику тестування двох частих мутацій екзона 8 гена *ATP7B* для жителів України методом ПДРФ.

З часу впровадження в практику генетичного тестування переважаючої для нашої популяції мутації с.3207C>A гена *ATP7B* генетично підтверджено діагноз у 17/56 пацієнтів, що становить 30,4%, включаючи 15 випадків гомозиготності. Усі особи з ознаками захворювання звертались з вираженими симптомами захворювання, а саме зі змінами рівня трансаміназ, криптогенним гепатитом, цирозом, сильним тремором, порушенням ходи, депресією та неконтрольованою агресією. Лише в одній особі підтвердили присутність кільця Кайзера-Флейшера на десцеметовій мембрані рогівки, хоча перші печінкові прояви передували неврологічним на 5 років. За відсутності правильного лікування захворювання прогресувало та призвело до серйозних неврологічних порушень та погіршення функціонального стану печінки. У чотирьох осіб з п'яти з неврологічними проявами кільце Кайзера-Флейшера не було виявлено, що вказує на те, що даний критерій не є, як вважалося раніше, високоінформативним для діагностики хвороби Вільсона.

Серед усіх випадків, які були верифіковані в ДУ «Інститут спадкової патології НАМНУ» менше третини діагностовано нами в дитячому віці. Згідно отриманих результатів, ХВ маніфестує у молодшому шкільному віці (6–7 років), однак прояви хвороби неспецифічні і стосуються ураження гепатобіліарної системи нез'ясованого генезу. За трьох річний період хворобу Вільсона у дитячому віці підтверджено у 10 осіб із 25, у яких була підозра на це захворювання, й переважно у другій декаді життя. Троє дітей мали вік менше 10 років. Ці дані свідчать про необхідність підвищення настороженості педіатрів щодо діагностики ХВ у дітей та підлітків.

Серед пацієнтів з України, які набрали три та більше балів відповідно до діагностичних критеріїв хвороби Вільсона, частота мажорної мутації с.3207C>A (H1069Q) гена *ATP7B* складає 82,6%. За даними літератури даний варіант є найпоширенішим не лише серед країн Європи, а й в США, Бразилії, західній Росії. Дані, наведені в таблиці 1.1., свідчать про широкий спектр мутацій гена *ATP7B* серед осіб з хворобою Вільсона. Для країн Європи характерні мутації в екзонах 14, 8, 15, 6 20. Для країн Азії в основному в екзоні 8, для Африканських країн екзонах 10,13 та 18, для США – в екзонах 14, 15, 18. Щодо мешканців західних областей України, то другим найбільш частим варіантом для пацієнтів з України є с.2304dupC, який складає 6,5% алелів серед генетично верифікованих випадків. Отримані показники вказують на доцільність застосування в практичній діагностиці та медико-генетичному тестуванні визначення саме цих мутацій. Слід вказати й на короткий час й невисоку собівартість запропонованих в роботі методів їх діагностики. Отримані результати вказують на високу інформативність генетичного тестування мутацій с.3207C>A та с.2304dupC гена *ATP7B* серед осіб із хворобою Вільсона з України. Базуючись на встановленому в роботі показнику гетерозиготного носійства мутації с.3207C>A серед жителів західноукраїнського регіону (1: 57) та частці цієї алелі серед пацієнтів з хворобою Вільсона (82,6%), частота гетерозиготного носійства різних

мутантних алелів гена *ATP7B* сягає 1 : 43, а передбачувана частота – 13061 жителів західного регіону України.

Для проведення генетичної діагностики патогенних варіантів на сьогодні є велика кількість методів. Місце їх застосування ґрунтується на перевагах та обмеженнях. У даній роботі було використано ПЛР та її модифікації, зокрема *Bi-PASA*, *real time PCR*, а також різні методи пост ампліфікаційного аналізу. Основними є аналіз в агарозному та ПААГ, плавлення з високою роздільною здатністю (HRM), секвенування за Сенгером та аналіз делецій/дуплікацій (MLPA). Широкий спектр було використано з метою пошуку оптимального методу діагностики, зважаючи на високу вартість та тривалість виконання більшості з них. Крім того, деякі методи (HRM) не зважаючи на низьку вартість та велику кількість зразків, що аналізуються одночасно, є скринінговими та вимагають підтвердження. Основна мета роботи – знайти оптимальні методи та зробити діагностику доступною для широкого використання. Саме тому вважаємо доцільною таку послідовність діагностики хвороби Вільсона : аналіз найпоширенішої мутації гена *ATP7B* (метод ПЛР *Bi-PASA*), аналіз кривих плавлення високої роздільної здатності 14 та 8 екзонів (HRM), аналіз делецій та дуплікацій (MLPA), секвенування окремих екзонів (за Сенгером), секвенування нового покоління (NGS) з аналізом інтронів.

Оскільки захворювання добре піддається лікуванню за умови вчасного призначення специфічної терапії важливо вчасно встановити діагноз. Хвороба може не мати класичних проявів, але генетична діагностика дозволяє виявити захворювання ще в досимптомному періоді. Чим менше навантаження міддю на момент діагностики, тим швидше та ефективніше буде лікування. Саме тому дуже важливо підвищити настороженість терапевтів, педіатрів, дитячих гастроентерологів, інфекціоністів щодо діагностики хвороби Вільсона в тому числі в дитячому віці, зважаючи на доступність патогенетичної терапії. При підвищенні рівня трансаміназ, навіть при нормальному рівні білірубіну та від'ємних тестах на вірусні гепатити рекомендовано проводити генетичне тестування на цю хворобу. Вважаємо доцільним проведення генетичного

дослідження в широкій вибірці пацієнтів з діагнозом автоімунний, криптогенний гепатит. Рекомендуємо впровадження в практику медико-генетичного консультування генетичне тестування двох мутацій (с.3207C>A та с.2304dupC), які є частими серед пацієнтів з хворобою Вільсона в Україні. Отримані результати вказують на значно вищу очікувану частоту цієї хвороби, її гіподіагностику та потребу підвищення настороженості лікарів щодо цієї генетичної хвороби в усіх випадках ідіопатичних гепатобіліарних порушень в осіб молодого віку. Зважаючи на доступність ефективної терапії при ідіопатичних гепатобіліарних захворюваннях вважаємо доцільним проводити генетичне тестування мажорних мутацій генів *ATP7B*, *HFE* та *UGT1A1*.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено теоретичне обґрунтування та нове вирішення науково-практичного завдання щодо визначення інформативності генетичного тестування алельних варіантів генів *ATP7B*, *HFE*, *UGT1A1* серед пацієнтів молодого віку з ідіопатичними гепатобіліарними порушеннями для використання в системі медико-генетичного консультування та діагностиці хвороби Вільсона.

1. Частота гетерозиготного носійства патогенного варіанту с.3207C>A в загальній вибірці мешканці Західних областей України становить 1 : 57; частота гетерозиготного носійства різних мутантних алелів гена *ATP7B* сягає 1 : 43, а передбачувана частота хвороби Вільсона визначається на рівні 1 : 13061 жителів західного регіону України.

2. Мутації гена *ATP7B* були підтверджені у 9,4% пацієнтів молодого віку з гепатобіліарними порушеннями нез'ясованого генезу. Мутації гена *HFE* були етіологічними чинником гепатобіліарних порушень у 5,8% пацієнтів. Частота гомозиготного носійства алелю A(TA)₇TAA гена *UGT1A1* серед осіб з ідіопатичними гепатобіліарними порушеннями становить 9,3%, що співпадає з частотою серед практичних здорових осіб.

3. Серед осіб з України з хворобою Вільсона частота мажорної мутації с.3207C>A (H1069Q) гена *ATP7B* складає 82,6%.

4. За результатами секвенування гена *ATP7B*, окрім найчастішого алелю зафіксовано такий спектр патогенних варіантів: с.2304dupC (8 екзон) с.2128G> A (8 екзон), с.3011A>C (13 екзон), с.3402delC (15 екзон), с.2827G>A (12 екзон). Другим за частотою серед генетично верифікованих випадків є алель с.2304dupC (7%).

5. У третини пацієнтів з хворобою Вільсона, за відсутності патогенних алелів в екзонних послідовностях гена *ATP7B*, виявили алельні варіанти нейтрального, або невизначеного значення, серед них одонуклеотидний поліморфізм, асоційований з підвищенням ризику розвитку хвороби Альцгеймера (с.2495A>G).

6. Генетична діагностика патогенних варіантів гена *ATP7B* рекомендована в усіх випадках ідіопатичних уражень печінки в осіб молодого віку, оскільки при хворобі Вільсона порушення зі сторони гепатобіліарної системи передують змінам з боку нервової системи, а внесок мутацій гена *ATP7B* переважає частку інших вивчених генетичних чинників.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Необхідно підвищити настороженість терапевтів, педіатрів, дитячих гастроентерологів, інфекціоністів щодо діагностики хвороби Вільсона в тому числі в дитячому віці, зважаючи на доступність патогенетичної терапії. При підвищенні рівня трансаміназ, навіть при нормальному рівні білірубіну та від'ємних тестах на вірусні гепатити рекомендовано проводити генетичне тестування на хворобу Вільсона-Коновалова. Вважаємо доцільним проведення генетичного дослідження в широкій вибірці пацієнтів з діагнозом автоімунний, криптогенний гепатит.

2. Рекомендовано впровадити в практику медико-генетичного консультування генетичне тестування двох мутацій (с.3207C>A та с.2304dupC), які є частими серед пацієнтів з хворобою Вільсона з України.

3. Отримані результати вказують на значно вищу очікувану частоту хвороби Вільсона, її гіподіагностику та потребу підвищення настороженості лікарів щодо цієї генетичної хвороби в усіх випадках ідіопатичних гепатобіліарних порушень в осіб молодого віку. Відсутність кільця Кайзера у переважної більшості пацієнтів свідчить про його низьку діагностичну значимість для цього моногенного захворювання.

4. Зважаючи на доступність ефективної терапії, при ідіопатичних гепатобіліарних захворюваннях проводити генетичне тестування мажорних мутацій генів *ATP7B*, *HFE* та *UGT1A1*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. A. Ala, A. Walker, K. Ashkan et al. Wilson's disease. *Lancet*. Vol. 369. P. 397–408, 2007.
2. A. Candan, L. Yaozong, W-S. Pernilla. The six metal binding domains in human copper transporter, *ATP7B*: molecular biophysics and disease-causing mutations, *Biometals*. Vol. 30(6). P. 823–840, 2017.
3. A. Członkowska, T. Litwin. Wilson disease - currently used anticopper therapy. Vol. 142. P. 181-191, 2017.
4. A. Gomes, GV. Dedoussis. Geographic distribution of *ATP7B* mutations in Wilson disease. *Ann. Hum. Biol.* Vol. 43. P. 1–8, 2016.
5. A. Koshy, RJ Mukkada, AP Chettupuzha et al. Hemochromatosis in India: First Report of Whole Exome Sequencing With Review of the Literature. *J Clin Exp Hepatol*. Vol. 10(2). P. 163-169, 2020.
6. A. Levy, M. Nissim, N. Mendelman et al. Ctr1 intracellular loop is involved in copper transfer mechanism to the Atox1 metallochaperone. *J Phys Chem B*. Vol. 120. P. 12334–12345, 2016.
7. A. Rastogi, N. Krishnani, R. Pandey. Dubin-Johnson syndrome--a clinicopathologic study of twenty cases. *Indian J Pathol Microbiol*. Oct;49(4):500-4, 2006.
8. A. Stättermayer, A. Entenmann, M. Gschwantler et al. The dilemma to diagnose Wilson disease by genetic testing alone. *European Journal of Clinical Investigation*. Vol. 49. P. 8, 2019.
9. A. Zarina, I. Tolmane, Z. Krumina et al. Association of Variants in the *CP*, *ATOX1* and *COMMD1* Genes with Wilson Disease Symptoms in Latvia. *Balkan J Med Genet*. Vol. 22(2). P. 37-42, 2019.
10. A. Zarina, L. Tolmane, M. Kreile et al. Genetic variation spectrum in *ATP7B* gene identified in Latvian patients with Wilson disease. *Mol. Genet. Genomic. Med*. Vol. 5 (4). P. 405–409, 2017.

11. Adzhubei, S. Schmidt, L. Peshkin et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods*. Vol. 7. P. 248–249, 2010.
12. Aggarwal, M. Bhatt. Advances in Treatment of Wilson Disease. *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)*. Vol. 8. P. 525, 2018.
13. AM Baart, MGJ Balvers, MTE Hopman et al. Reticulocyte hemoglobin content in a large sample of the general Dutch population and its relation to conventional iron status parameters. *Clin Chim Acta*. Vol. 483. P. 20–24, 2018.
14. Ana Alvarez-Fernandez, María J. Bernal, Isabel Fradejas, Alexandra Martín Ramírez. KASP: a genotyping method to rapid identification of resistance in *Plasmodium falciparum*/ *Malaria Journal*. V. 20 (16), 2021.
15. Annie Niehaus, Danielle Azzariti, Steven Harrison, Marina DiStefano, Hemphill Sarah, Senol-Cosar Ozlem, Rehm Heidi. A survey assessing adoption of the ACMG-AMP guidelines for interpreting sequence variants and identification of areas for continued improvement. *COMMENT*. V. 21(8), P1699-1701, Aug 01, 2019.
16. B. Anon, C. Perray, D. Regnault et al. A study of the association between UGT1A1*28 variant allele of *UGT1A1* gene and colonic phenotype of sporadic colorectal cancer. *Dig Liver Dis*. Vol. 51(4). P. 579-583, 2019.
17. B. Joseph, V. Morkhov, M. Yulikov et al. Conformational cycle of the vitamin B₁₂ABC importer in liposomes detected by Double Electron-Electron Resonance (DEER). *J Biol Chem*. Vol. 289. P. 3176–3185, 2014.
18. B.Zubaida, HA Cheema, MA Hashmi, M. Naeem. Spectrum of UGT1A1 variants in Pakistani children affected with inherited unconjugated hyperbilirubinemias. *Clin Biochem*. Vol. 69. P. 30-35, 2019.
19. C. Collet, J-L. Laplanche, J. Page et al. High genetic carrier frequency of Wilson's disease in France: discrepancies with clinical prevalence. *BMC Medical Genetics*. Vol. 19. P. 143, 2018
20. C. Corpechot, O. Chazouilleres, R.Poupon. Early primary biliary cirrhosis: biochemical response to treatment and prediction of long-term outcome. *J. Hepatol*. Vol. 55. P. 1361–1367, 2011.

21. C. Taggart, D. Cervantes-Laurean, G. Kim. Oxidation of either methionine 351 or methionine 358 in alpha 1-antitrypsin causes loss of anti-neutrophil elastase activity. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 275 (35), P: 27258–65.
22. CD. Warne. *HFE* p.C282Y homozygosity predisposes to rapid serum ferritin rise after menopause: A genotype-stratified cohort study of hemochromatosis in Australian women. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. Vol. 32(4). P. 797–802, 2017.
23. CH Yu, W. Lee, S. Nokhrin, OY Dmitriev. The Structure of Metal Binding Domain 1 of the Copper Transporter *ATP7B* Reveals Mechanism of a Singular Wilson Disease Mutation. *Scientific Reports*. Vol. 12(8). P. 581-582, 2018.
24. D. I. Grupchev, M. N. Radeva, M. Georgieva et al. In vivo confocal microstructural analysis of corneas presenting Kayser–Fleischer rings in patients with Wilson’s disease. *Arq. Bras. Oftalmol*. Vol. 81. P. 137–143, 2018.
25. D. Kolarich, A. Weber, PL. Turecek et al. Comprehensive glyco-proteomic analysis of human alpha1-antitrypsin and its charge isoforms. *Proteomics*. Vol. 6 (11), P: 3369–80, 2016.
26. E. Hanson, G. Imperatore, W. Burke. *HFE* gene and hereditary hemochromatosis: A HuGE review. *Am. J. Epidemiol*. Vol. 158. P. 293- 296, 2009.
27. E. Ilyechova, I. Miliukhina, M. Karpenko. Case of Early-Onset Parkinson's Disease in a Heterozygous Mutation Carrier of the *ATP7B* Gene. *J Pers Med*. Vol. 17(9). pii: E41, 2019.
28. E. Roberts, P. Socha. Wilson disease in children, *Handb Clin Neurol*. Vol. 142. P. 141-156, 2017.
29. E. van de Steeg, V. Stránecký, H. Hartmannová et al. Complete OATP1B1 and OATP1B3 deficiency causes human Rotor syndrome by interrupting conjugated bilirubin reuptake into the liver. *The Journal of Clinical Investigation*. Vol. 122 (2), P: 519–28, 2012.
30. E. Vance, JD Gonzalez Murcia, JB Miller. Failure to detect synergy between variants in transferrin and hemochromatosis and Alzheimer's disease in large

cohort. Alzheimer's Disease Genetics Consortium (ADGC). *Neurobiol Aging*. pii: S0197-4580(20)30027-0, 2020.

31. EA. Roberts. Update on the Diagnosis and Management of Wilson Disease. *Curr Gastroenterol Rep*. Vol. 5. P. 56, 2018.

32. EA. Semenova, E. Miyamoto-Mikami, EB Akimov et al. The association of *HFE* gene H63D polymorphism with endurance athlete status and aerobic capacity: novel findings and a meta-analysis. *Eur J Appl Physiol*. Vol. 120(3). P. 665-673, 2020.

33. European Association For The Study Of The Liver EASL clinical practice guidelines Wilson's disease. *J Hepatol*. Vol. 56(3). P. 671–685, 2012.

34. F. Wu, J. Wang, C. Pu. et al. Wilson's disease: a comprehensive review of the molecular mechanisms. *Int. J. Mol. Sci*. Vol. 16. P. 6419–6423, 2015.

35. G. Porto, P. Brissot, D. W. Swinkels, H. Zoller, O. Kamarainen, S. Patton et al. EMQN best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of hereditary hemochromatosis (HH). *Eur. J. Hum. Genet*. Vol. 24. P. 479–495, 2016.

36. G. Sarode, K. Kim, D. Kieffer et al. Metabolomics profiles of patients with Wilson disease reveal a distinct metabolic signature. *Metabolomics*. Vol. 15. № 3. P. 1505-1511, 2019.

37. H. Corey, L. Woonghee, S. Nokhrin, O. Dmitriev. Binding Domain 1 of the Copper Transporter *ATP7B* Reveals Mechanism of a Singular Wilson Disease Mutation. *Scientific Reports*. Vol. 12(8). P. 581-582, 2018.

38. H. Hayashi, K. Watanabe, A. Inui. et al. Alanine Aminotransferase as the First Test Parameter for Wilson's Disease. *J Clin Transl Hepatol*. Vol. 7(4). P.293-296, 2019.

39. H. Hofer, C. Willheim-Polli, P. Knoflach et al. Identification of a novel Wilson disease gene mutation frequent in Upper Austria: a genetic and clinical study. *Hum. Genet*. Vol. 57 (9). P. 564–567, 2012.

40. H. Pierson, A. Muchenditsi, B. Kim et al. The Function of ATPase Copper Transporter *ATP7B* in Intestine. *Gastroenterology*. Vol. 154(1). P. 168-180.e5, 2018.

41. H. Polakova, B. Katrincsakova, G. Minarik et al. Detection of His1069Gln mutation in Wilson disease by bidirectional PCR amplification of specific alleles (BI-PASA) test. *Gen. Physiol. Biophys.* Vol. 26. P. 91–96, 2007.
42. H. Polakova, B. Katrincsakova, G. Minarik et al. Detection of His1069Gln mutation in Wilson disease by bidirectional PCR amplification of specific alleles (BI-PASA) test. *Gen. Physiol. Biophys.* Vol. 26. P. 91–96, 2007.
43. H. Yu, N. Yang, J. Bothe et al. The metal chaperone Atox1 regulates the activity of the human copper transporter ATP7B by modulating domain dynamics. *J Biol Chem.* Vol. 292(44). P. 18169-18177, 2017.
44. H. Zhong, H. Sun, L. Xue et al. Differential hepatic features presenting in Wilson disease-associated cirrhosis and hepatitis B-associated cirrhosis. *World Journal of Gastroenterology.* Vol. 25(3). P. 378-387, 2019.
45. HB. El-Serag, JM. Inadomi, KV. Kowdley. Screening for hereditary hemochromatosis in siblings and children of affected patients. A cost-effectiveness analysis. *Ann. Intern. Med.* Vol. 152. P. 261- 269, 2009.
46. <http://www.wilsondisease.med.ualberta.ca/search3.asp>
47. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
48. I. Machida, S. Wakusawa, F. Sanae Et al. Mutational analysis of the MRP2 gene and long-term follow-up of Dubin-Johnson syndrome in Japan. *J Gastroenterol.* Vol. 40(4), P:366-70, 2005.
49. I. Scheiber, R. Bruha, P. Dusek. Pathogenesis of Wilson disease. *Handb. Clin. Neurol.* Vol. 142. P. 43–55, 2017.
50. IJ. Chang, HH. Si , The genetics of Wilson disease. *Handbook of Clinical Neurology.* Vol. 142. P. 19–34, 2017.
51. J. Chin, LW Powell, LE Ramm et al. Utility of hepatic or total body iron burden in the assessment of advanced hepatic fibrosis in HFE hemochromatosis. *Sci Rep.* Vol. 9(1). P. 20234, 2019.
52. J. Gao, S. Brackley, JP. Mann. The global prevalence of Wilson disease from next-generation sequencing data. *Genet Med.* Vol. 21. (5). P. 1155-1163, 2019.

53. J. Glaenger, M. Peter, G. Thomas, G. PELDOR spectroscopy reveals two defined states of a sialic acid TRAP transporter SBP in solution. Hagelueken. *Biophys J*. Vol. 112. P. 109–120, 2017.
54. J. Liu, J. Luan, X. Zhou et al. Epidemiology, diagnosis, and treatment of Wilson's disease. *Intractable Rare Dis. Res.* Vol. 6 (4). P. 249–255, 2017.
55. J. Liu, Y. Cui, L. Shi et al. A cellular model for Wilson's disease using patient-derived induced pluripotent stem cells revealed aberrant β -catenin pathway during osteogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Apr 6. pii: S0006-291X(19)30635-7, 2019.
56. J. M. Stapelbroek, C. W. Bollen, J. K van Amstel. et al. The H1069Q mutation in ATP7B is associated with late and neurologic presentation in Wilson disease: results of a meta-analysis. *J. Hepatol.* Vol. 41. P. 758–763, 2004.
57. J. Petters, C. Cimmaruta, K. Iwanov et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines AKOSi002-A and AKOSi003-A from symptomatic female adults with Wilson disease. *Stem Cell Res.* Vol. 43. P. 101708, 2020.
58. J. Raszeja-Wyszomirska, G. Kurzawski, J. Suchy et al. Frequency of mutations related to hereditary haemochromatosis in northwestern Poland. *Journal of Applied Genetics*, Vol. 49, P:105–107, 2008.
59. JH. Lee, HL. Chen et al. Neonatal Dubin-Johnson syndrome: long-term follow-up and MRP2 mutations study. *Pediatr Res.* Vol. 59(4 Pt 1), P:584-9, 2006.
60. K. Hikino, T. Ozeki, M. Koido *et al.* Comparison of effects of UGT1A1*6 and UGT1A1*28 on irinotecan-induced adverse reactions in the Japanese population: analysis of the Biobank Japan Project. *J Hum Genet.* Vol. 64(12). P. 1195-1202, 2019.
61. K. Rodriguez-Castro, F. Hevia-Urrutia, G. Sturniolo. Wilson's disease: a review of what we have learned. *World J. Hepatol.* Vol. 7 (29). P. 2859–2870, 2015.
62. K. Tomiyasu, T. Oshima, M. Yoshii, et al. Wilson's disease presenting as Asperger syndrome. *Rinsho Shinkeigaku.* Vol. 59(9). P. 589-591, 2019

63. K. Weiss, D. Gotthardt, D. Klemm et al. Zinc monotherapy is not as effective as chelating agents in treatment of Wilson disease. *Gastroenterol.* Vol. 140. P. 1189–1198, 2011.
64. KH Barbara, L. Marcin, A. Jedrzej et al. The impact of H63D *HFE* gene carriage on hemoglobin and iron status in children. *Ann Hematol.* Vol. 95(12). P. 2043–2048, 2016.
65. KP Shanmugavel, R. Kumar, Y. Li, P. Wittung-Stafshede. Wilson disease missense mutations in *ATP7B* affect metal-binding domain structural dynamics. *Biometals.* Vol. 32(6). P. 875-885, 2019.
66. KP. Shanmugavel , P. Wittung-Stafshede. Copper relay path through the N-terminus of Wilson disease protein, *ATP7B*. *Metallomics.* Vol. 11. P. 1472-1480, 2019.
67. L. Davies, G. Macintyre, D. Cox. New mutations in the Wilson disease gene, *ATP7B*: implications for molecular testing. *Genet Test.* Vol. 12 (1). P. 139–145, 2008.
68. L. Huamei, L. Lifang, L. Yun et al. Familial screening of children with Wilson disease: Necessity of screening in previous generation and screening methods. *Medicine Baltimore.* Vol. 97(27). P. e11405, 2018.
69. M. Faoucher, C. Demily. The psychopharmacology of Wilson disease and other metabolic disorders. *Handb Clin Neurol.* Vol. 165. P. 191-205, 2019.
70. M. Guindi. Wilson disease. *Semin Diagn Pathol.* Vol. 36(6). P. 415-422, 2019.
71. M. Kathawala, GM. Hirschfield. Insights into the management of Wilson's disease. *Therapeutic Advances in Gastroenterology.* Vol. 10(11). P. 889–905, 2017.
72. M. Khosravifarsani, A. Shabestani, M. Pouramir, E. Zabihi. Effects of Fenton Reaction on Human Serum Albumin: An In Vitro Study. *Electron Physician.* Vol. 8(9). P. 2970–2976, 2016.

73. M. Skowrońska, T. Litwin, K. Dzieżyc. Does brain degeneration in Wilson disease involve not only copper but also iron accumulation? *Neurol. Neurochir. Pol.* Vol. 47 (6). P. 542–546, 2013.
74. M. Sridhar, A. Rangaraju, K. Anbarasu. Evaluation of Kayser–Fleischer ring in Wilson disease by anterior segment optical coherence tomography. *Indian. J. Ophthalmol.* Vol. 65. P. 354–357, 2017.
75. M. Sridhar. Advantages of anterior segment optical coherence tomography evaluation of the Kayser–Fleischer ring in Wilson disease. *Cornea.* Vol. 36. P. 343–346, 2017.
76. Mark L Brantly. Jorge E Lascano. Abbas Shahmohammadi. Intravenous Alpha-1 Antitrypsin Therapy for Alpha-1 Antitrypsin Deficiency: The Current State of the Evidence. *Chronic Obstructive Pulmonary Diseases.* Vol. 6 (1), P: 100–114, 2018.
77. МВ. Щербініна. Особи з ознаками захворювання з синдромом Жильєра: нова тактика ведення. Здоров'я України. *Гастроентерологія. Гепатологія. Колопроктологія.* Вип. 4 (34). С. 49-50, 2014.
78. MJ Huang, YC Chen, YY Huang *et al.* Effect of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 activity on risk for developing Gilbert's syndrome. *Kaohsiung J Med Sci.* Vol. 35(7). P. 432-439, 2019.
79. MJ Wood, DHG Crawford, LF Wockner *et al.* Serum ferritin concentration predicts hepatic fibrosis better than hepatic iron concentration in human HFE-Haemochromatosis. *Liver Int.* Vol. 37(9). P. 1382–8, 2017.
80. MK. Verheul, A. Yee, Seaman A *et al.* Identification of carbamylated alpha 1 anti-trypsin (A1AT) as an antigenic target of anti-CarP antibodies in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Autoimmunity.* Vol. 80, P: 77–84, 2017.
81. MS. Devgun, AM. El-Nujumi, GJ. O'Dowd, V. Barbu, R. Poupon. Novel mutations in the Dubin-Johnson syndrome gene ABCC2/MRP2 and associated biochemical changes. *Ann Clin Biochem.* Vol. 49(Pt 6), P:609-12, 2012.
82. MT. Lorincz. Wilson disease and related copper disorders. *Handb Clin Neurol.* Vol. 147. P. 279-292, 2018.

83. N. Erlenbach, B. Endeward, P. Schops et al. Flexibilities of isoindoline-derived spin labels for nucleic acids by orientation selective PELDOR. *Chem Phys.* Vol. 18. P. 16196–16201, 2016.
84. N. Memon, BI. Weinberger, T. Hegyi, LM. Aleksunes. Inherited disorders of bilirubin clearance. *Pediatr Res.* Vol. 79(3), P:378-86, 2016.
85. N. Shimizu. Diagnosis and treatment of Wilson disease in Japan. *Rinsho Shinkeigaku.* Vol. 59(9). P. 565-569, 2019.
86. N. Tang, TD. Sandahl, P. Ott, KP. Kepp. Computing the Pathogenicity of Wilson's Disease *ATP7B* Mutations: Implications for Disease Prevalence. *J Chem Inf Model.* Vol. 59(12). P. 5230-5243, 2019.
87. NM. Jandl, T. Rolvien, T. Schmidt et al. Impaired Bone Microarchitecture in Patients with Hereditary Hemochromatosis and Skeletal Complications. *Calcif Tissue Int.* 2020. doi: 10.1007/s00223-020-00658-7.
88. O. Bandmann, K. Weiss, S. Kaler. Wilson's disease and other neurological copper disorders. *Lancet Neurol.* Vol. 14 (1). P. 103–13, 2015.
89. O. Hermine. Eighty percent of French sport winners in Olympic, World and Europeans competitions have mutations in the hemochromatosis HFE gene. *Biochimie*, 2015, vol. 119. DOI: 10.1016/j.biochi.2015.09.028
90. OS. Olatunya. Uridine diphosphate glucuronosyl transferase 1A (UGT1A1) promoter polymorphism in young patients with sickle cell anaemia: report of the first cohort study from Nigeria. *BMC Med Genet.* Vol. 20(1). P. 160, 2019.
91. P. Adams, A. Altes, P. Brissot et al. Therapeutic recommendations in HFE hemochromatosis for p.Cys282Tyr (C282Y/C282Y) homozygous genotype. *Hepatol. Int.* Vol. 12. P. 83–86, 2018.
92. P. Brissot, A. Pietrangelo, PC Adams et al. Haemochromatosis. *Nat. Rev. Dis. Primers.* Vol. 4. P. 8016, 2018.
93. P. Dusek, P. Roos, T. Litwin et al. The neurotoxicity of iron, copper and manganese in Parkinson's and Wilson's diseases. *Trace Elem. Med. Biol.* Vol. 31. P. 193–203, 2015.

94. P. Ferenci, P.Ott. Wilson's disease: Fatal when overlooked, curable when diagnosed. *Journal of Hepatology*. Vol. 10. P. 1016, 2019.
95. P. Ferenci, T. Litwin, J. Seniow, A. Czlonkowska. Encephalopathy in Wilson disease: copper toxicity or liver failure. *Clin Exp. Hepatol*. Vol. 5(1). P. 88–95, 2015.
96. P. Hedera. Update on the clinical management of Wilson's disease. *The Application of Clinical Genetics*. Vol. 10. P. 9-19, 2017.
97. P. Socha, W. Janczyk, A. Dhawan, U. Baumann. Wilson's Disease in Children. A Position Paper by the Hepatology Committee of the European Society for Paediatric Gastroenterology. *Hepatology and Nutrition JPGN*. V. 66(2). P. 334–344, 2018.
98. QF. Xiong, YD. Zhong, XN. Feng et al. Study on spectrum of *UGT1A1* mutations in connection with inherited non-hemolytic unconjugated hyperbilirubinemia. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. Vol. 26(12). P. 898-902, 2018.
99. R. Cocos, A. Sendroiu, S. Schipor et al. Genotype-phenotype correlations in a mountain population community with high prevalence of Wilson's disease: genetic and clinical homogeneity. *PLoS One*. Vol. 9. P. e98520, 2014.
100. R. Kilambi, A. Singh, K. Madhusudhan et al. Choledochal cyst of the proximal cystic duct: a taxonomical and therapeutic conundrum. *Surg Ann R Coll Engl*. Vol. 100(2). P. 34-37, 2018.
101. R. Peculis, B. Lace, A. Putnina et al. HFE-related hemochromatosis risk mutations in Latvian population. *Annals of Hematology*, Vol. 94, P: 343–344, 2015.
102. R. Prasad. New Horizons in Correction of Mutated *ATP7B* in Wilson Disease Using Pharmacological Agents: Precise Medicine. *Indian J Clin Biochem*. Vol. 34(4). P. 369-370, 2019.
103. RS. Polishchuk, EV. Polishchuk. From and to the Golgi - defining the Wilson disease protein road map. *FEBS Lett*. Vol. 593(17). P. 2341-2350, 2019.
104. S. Anai, E. Iwama, Y. Yoneshima et al. Association of nephrotoxicity during platinum-etoposide doublet therapy with *UGT1A1* polymorphisms in small cell lung cancer patients. *Lung Cancer*. Vol. 126. P. 156-161, 2018.

105. S. Bucossi S. Mariani, M. Ventriglia, R. et al. Association between the c. 2495A>G *ATP7B* Polymorphism and Sporadic Alzheimer's Disease. *International Journal of Alzheimer's Disease*. Vol. 9, 2011.
106. S. Cleymaet, K. Nagayoshi, E. Gettings, J. Faden. A review and update on the diagnosis and treatment of neuropsychiatric Wilson disease. *Expert Review of Neurotherapeutics*. Vol. 10. P. 1-10, 2019.
107. S. Cope-Yokoyama, M. Finegold, G. Sturniolo et al. Wilson disease: histopathological correlations with treatment on follow-up liver biopsies. *World J. Gastroenterol*. Vol. 16. P. 1487–1494, 2010.
108. S. Erlinger, IM. Arias, D. Dhumeaux. Inherited disorders of bilirubin transport and conjugation: new insights into molecular mechanisms and consequences. *Gastroenterology*. Vol. 146(7), P:1625-38, 2014.
109. S. Juzenas. Association of HFE gene C282Y and H63D mutations with liver cirrhosis in the Lithuanian population. *Medicina*, vol. 52(5), 2016,
110. S. Maghool, S. Fontaine, BR Roberts et al. Human glutaredoxin-1 can transfer copper to isolated metal binding domains of the P1B-type ATPase, *ATP7B*. *Sci Rep*. Vol. 10(1). P. 4157, 2020.
111. S. Tanner. Clinical and Translational Perspectives on WILSON DISEASE, *Science Direct*. P. 1-11, 2019.
112. S. Vrabelova, O. Letocha, M. Borsky, L. Kozak. Mutation analysis of the *ATP7B* gene and genotype/phenotype correlation in 227 patients with Wilson disease. *Mol. Genet. Metab*. Vol. 86. P. 277–285, 2005.
113. S. Wilson. Progressive lenticular degeneration: A familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver. *Brain*. P. 295–509, 1912.
114. SA Alkins, P. O'Malley. Should health-care systems pay for replacement therapy in patients with alpha(1)-antitrypsin deficiency? A critical review and cost-effectiveness analysis. *Chest*. Vol. 117 (3), P: 875–80, 2012.
115. Sohajda Z., Hódos M., Módis L. Corneal disorders in Wilson's disease. *Orv. Hetil*. 2019. Apr; Vol. 160 (14). P. 555–557.

116. SY Jia, DH Zhou, XJ Ou, J. Huang. Progress in molecular mechanism of hepatolenticular degeneration induced by *ATP7B* gene mutation. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. Vol. 28(2). P. 188-192, 2020.
117. TH. Karlsen , F. Lammert , RJ. Thompson . From pathophysiology to clinical practice. *J Hepatol*. Apr;62(1 Suppl):S6-S14, 2015.
118. TJ Ma, GL Sun, F. Yao, ZL Yang. Wilson disease associated with immune thrombocytopenia: A case report and review of the literature. *World J Clin Cases*. Vol. 7(17). P. 2630-2636, 2019.
119. TY Shiu, HH Huang, HH Lin et al. Restriction fragment length polymorphism effectively identifies exon 1 mutation of *UGT1A1* gene in patients with Gilbert's Syndrome. *Liver. Int*. Vol. 35(8). P. 2050- 6, 2015.
120. W. Li, C. Chen, Z. You et al. Current Drug Managements of Wilson's Disease: From West to East. *Curr Neuropharmacol*, Vol. 14(4). P. 322-5, 2016.
121. W. Zhang, X. Wang, W. Duan et al. HFE-Related Hemochromatosis in a Chinese Patient: The First Reported Case. *Front Genet*. Vol. 11. P. 77, 2020.
122. X. Li,W. Zhang, D. Zhou et al. Complex *ATP7B* mutation patterns in Wilson disease and evaluation of a yeast model for functional analysis of variants. *Human Mutation*. Vol. 40(5). P. 552-565, 2019.
123. XX Mi, J. Yan , XJ Ma *et al*. Analysis of the *UGT1A1* Genotype in Hyperbilirubinemia Patients: Differences in Allele Frequency and Distribution. *Biomed Res Int*. Vol. P. 1-10, 2019.
124. Y. Han, H. Cheng, J. Toledo et al. Impaired functional default mode network in patients with mild neurological Wilson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord*. Vol. 30. P. 46–51, 2016.
125. Y. Hatori, S. Lutsenko. The Role of Copper Chaperone Atox1 in Coupling Redox Homeostasis to Intracellular Copper Distribution. *Antioxidants (Basel)*. Vol. 5(3). P. 25, 2016.
126. Y. Lekomtseva, I. Voloshyn-Gaponov, G. Tatayna. Targeting Higher Levels of Tau Protein in Ukrainian Patients with Wilson's Disease. *Neurol. Ther*. Mar 27. doi: 10.1007/ s40120-019-0134-3, 2019.

127. Y. Leng, P. Li, L. Zhou et al. Long-Term Correction of Copper Metabolism in Wilson's Disease Mice with AAV8 Vector Delivering Truncated ATP7B. *Hum Gene Ther.* Vol. 30(12). P. 1494-1504, 2019.
128. Y. Zhang, D. Wang, W. Wei, X. Zeng. Wilson's disease combined with systemic lupus erythematosus: a case report and literature review. *BMC Neurol.* Vol. 18. P. 85, 2018.
129. Болезни печени и желчевыводящих путей. — Изд. 2-е / Под ред. В.Т. Ивашкина. — М.: *М-Вести*, С. 536, 2005.
130. В. Пономарьов. Хвороба Вільсона-Коновалова: “великий хамелеон”. *Медичний неврологічний журнал.* Вип. 3(33). С. 117–122, 2010.
131. Г.В. Сухарева. Гепатолентикулярная дегенерация. Под ред. Л.Б. Лазебник. — М.: *Анахарсис*, С. 199-209, 2005.
132. ГВ. Макух, ДВ. Заставна, МЯ. Тиркус. Патент 32044 UA, МПК G01N33/49 (2006.01) Спосіб виділення ДНК з лейкоцитів периферійної крові. Заявник ДУ « Інститут спадкової патології НАМН України» – № u200801896Vol. заявл. 14.02.2008. Vol. опубл. 25.04.2008, бюл. № 8.
133. Є. О. Труфанов Діагностика та лікування. хвороба Вільсона. «Світ Медицини та Біології. Вип. 4(66). С. 117-120, 2018.
134. Є. Труфанов, В. Реннер, М. Мищенко та ін. Клинический случай болезни Вильсона-Коновалова: трудности диагностики. *Український медичний альманах.* Вип. 15. № 5. С. 460–462, 2012.
135. З.А. Залялова, Э.И. Богданов. Клинико-МРТ анализ различных вариантов болезни Коновалова-Вильсона. *Неврологический вестник.* Вип. 1–2. С. 5-10, 2002.
136. И. В. Вахлова, Л. Е. Сафронова, С. В. Овчинникова, Е. П. Новожилова. Болезнь Вильсона у детей. Сложный для диагностики клинический случай / *Уральский мед. журнал.* № 6. С. 68–70, 2013.
137. И.А. Иванова-Смоленская. Болезнь Вильсона-Коновалова. *Нервы.* Вип. 4. С. 12-17, 2006.

138. І. Гайбонюк. Спектр і частота мутацій гена *ATP7B* в різних популяціях та етнічних групах. *Вісник ЛНУ*. Вип. 80. С. 3-11, 2019.
139. ІЄ. Гайбонюк, ГВ. Макух, МЯ. Тиркус, Бі. Третьак, ІМ. Яджин. Мутація Н1069Q гена *ATP7B* та С282Y та Н63D гена *HFE* у осіб з гепатобіліарними порушеннями нез'ясованого генезу. *Вісник проблем біології та медицини*. Вип. 3 (152). С. 227-231, 2019.
140. Калькулятор для расчета статистики в исследованиях "случай-контроль" [Електронний ресурс]. – Режим доступу. http://genex.ru/calculator_or.php.
141. Клинические разборы: Внутренние болезни / Под ред. Н.А. Мухина. — М.: Литтерра, С. 608, 2005.
142. <https://www.slideshare.net/santoshpathak817/hardyweinberg-law>.
143. М. Мищенко, І.Волошин-Гапонов. Современные аспекты Болезни Вильсона. *Міжнародний неврологічний журнал*. Вип. 2(72). С. 20-21, 2015.
144. Міністерство охорони здоров'я України. Наказ від 26 липня 2016 року N769. Уніфікований клінічний протокол первинної та вторинної пр(спеціалізованої) медичної допомоги. Хвороба Вільсона.
145. Нарушение обмена меди. Гепатоцеребральная дистрофия // Мед. журнал. — Режим доступа: genmed.ru [http:// genmed.ru/med_b1_201_03.html](http://genmed.ru/med_b1_201_03.html)
146. О. І. Волошин, Присяжнюк В. П., Кондревич М. І. Захворювання Вільсона-Коновалова: сучасний погляд на проблему та власний досвід. *Сучасна гастроентерологія*. № 3. С. 32–36, 2014.
147. ОС. Варламова. Вірусний гепатит А та синдром Жильбера. Конференція присвячена гепатитам: сучасний погляд на проблему. С. 12–13, 2016.
148. ТВ. Сорохман, О-МВ. Попелюк, ОВ. Макарова. Синдром Жильбера: термінологія, епідеміологія, генетика, патогенез (частина 1). *Здоров'я дитини*. Вип. 8(76). С. 82-86, 2016.

149. ТВ. Сорохман, Попелюк ТВ, Попелюк О-МВ. Синдром Жильбера: клініка, діагностика, диференціальна діагностика та лікування (частина 2). *Здоров'я дитини..* Вип. 12(1). 2017.

150. Ю.М. Степанов, В.И. Диденко. Современные методы верификации фиброза печени. *Здоров'я України (тематичний номер «Гастроентерологія»)*. Вип. 30. № 4. С. 30-31, 2013.

ДОДАТКИ

Додаток А

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА:

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Makukh H., Hayboniuk* I., Zarina A., Semeriak O. M., Gailite L. Mutations in the *ATP7B* Gene in Ukrainian Patients with High Risk of Wilson's Disease, *Cytol Genet.*, 2020, vol. 54, no. 4, pp. 324–332. Електронна версія: <https://cytgen.com/en/2020/53-62N4V54.htm> (Scopus). *Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальних досліджень, роботі з літературою, інтерпретації результатів досліджень, підготовці статті до друку.*
2. Гайбонюк І. Спектр і частота мутацій гена *ATP7B* в різних популяціях та етнічних групах. *Вісник Львівського університету: Серія біологічна.* 2019. № 80. С. 3-12. Електронна версія: <http://publications.lnu.edu.ua/bulletins/index.php/biology/article/view/1008>. *Особистий внесок здобувача полягає у проведення роботи з літературою та підготовці статті до друку.*
3. Гайбонюк І.Є., Макух Г.В., Тиркус М.Я., Третяк Б.І., Яджин Л. М. Мутації Н1069Q гена *ATP7B* та С282Y та Н63D гена *HFE* в осіб з гепатобіліарними захворюваннями нез'ясованого генезу. *Вісник проблем біології і медицини.* 2019. № 1 (149). С. 224-229. Електронна версія: [https://vpbm.com.ua/ua/vyipusk-1-tom-2-\(149\),-2019/12179](https://vpbm.com.ua/ua/vyipusk-1-tom-2-(149),-2019/12179). *Особистий внесок здобувача полягає у проведенні лабораторних досліджень, роботі з літературою, інтерпретації результатів досліджень, підготовці статті до друку.*

* Hayboniuk (Гайбонюк) – дівоче прізвище здобувачки Шиманської І.Є.

4. Гайбонюк І.Є., Макух Г.В. Аналіз низько функціональної алелі 7(TA) гена *UGT1A1* серед вибірки практично здорових осіб Західного регіону України. *Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна, Серія «Біологія»*. 2019. № 33. С.28-34. Електронна версія: <https://periodicals.karazin.ua/biology/article/view/14692>. *Особистий внесок здобувача полягає у проведенні лабораторних досліджень, роботі з літературою, інтерпретації результатів досліджень, підготовці статті до друку.*

5. Гайбонюк І.Є., Кравченко С.А., Макух Г.В., Дац-Опока М.І., Пампуха В.М., Третяк Б.І., Кіселик І.О. Частота асоційованого з синдромом Жильбера низько функціонального алелю 7(TA) гена *UGT1A1* (rs8175347) в Україні. *Вісник проблем біології і медицини*. 2020. Випуск 2 (156), С. 91-96. Електронна версія: [https://vpbm.com.ua/ua/vyipusk-2-\(156\),-2020/13831](https://vpbm.com.ua/ua/vyipusk-2-(156),-2020/13831). *Особистий внесок здобувача полягає у проведенні лабораторних досліджень, роботі з літературою, інтерпретації результатів досліджень, підготовці статті до друку.*

Публікації, що засвідчують апробацію матеріалів дисертації

2. Haiboniuk Ivanna, Kitsera Nataliya, Osadchuk Zoriana, Tretyak Bogdan, Makukh Halyna. Frequency of the HFE gene mutation C282Y and H63D in patients with hepatobiliary disease from Lviv region. *J Sci Discov* (2021); 5(2): jsd21005.

3. Haiboniuk I., Dats-Opoka M., Makukh H., Wojko Ya., Kiselyk I. Genetic diagnostics and clinical features of Wilson's disease in children. *EUREKA. Life sciences*. 2020. Vol. 2. P. 3-9.

4. Гайбонюк І., Макух Г.В., Завгородня Н.Г., Лук'яненко О.Ю., Семеряк О. Результати генетичної діагностики мутацій гена *ATP7B* серед осіб високого ризику хвороби Вільсона. Тези доп. Міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених, присвяченої 25-ти річчю Національної академії медичних наук України. Київ. 2018. С. 108-109.

5. Haiboniuk I., Zarina A., Rots D., Gailite L., Makukh H., Kovaliv I. The results of genetic diagnostic of *ATP7B* gene mutations among individuals with high-risk of Wilson's disease. Book of Abstr. ESHG Conference, Gothenburg. Sweden. June 15-18, 2019.

6. Haiboniuk I., Makukh H., Zarina A., Gailite L. The molecular-genetic diagnostic of Wilson's disease among patients from Ukraine. Book of Abstr. 5th Annual International Remote Conference Science and Society. Canada. 2020. P.109-110.

7. Гайбонюк І.Є., Макух Г.В. Генетична діагностика при ураженнях гепатобіліарної системи нез'ясованого генезу. Тези доп. XVI-й Міжнародної конференції студентів, молодих вчених та фахівців, присвяченої 25-річчю від дня відродження кафедр внутрішньої медицини, внутрішніх хвороб, загальної та клінічної імунології та алергології медичного факультету Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Харків. 28-28 березня, 2019. С. 64-65.

8. Shymanska I., Tyrka M., Zastawna D., Makukh H., Tyrkus M. Approach of HRM analysis for *ATP7B* gene common variants screening. Book of Abstr. ESHG Conference, Vienna, Austria. June 11-14. 2022. E-P16-007.

Відомості про апробацію результатів дисертації:

1. Науково-практична конференція «Муковісцидоз в Україні: стан та перспективи діагностики, лікування й соціальної адаптації пацієнтів» із симпозиумом «Орфанні захворювання у дітей та дорослих». 12-14 жовтня. Львів. 2017. Форма участі - очна, усна доповідь.

2. Міжнародна науково-практична конференція молодих вчених, присвячена 25-ти річчю національної академії медичних наук України. Київ. 23 березня, 2018. Форма участі – заочна.

3. ESHG Conference, Gothenburg. Sweden. June 15-18, 2019. Форма участі – дистанційна участь, постерна доповідь.

4. XVI Міжнародна конференція студентів, молодих вчених та фахівців, присвячена 25-річчю від дня відродження кафедр внутрішньої медицини, внутрішніх хвороб, загальної та клінічної імунології та алергології медичного факультету Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Харків. 28-29 березня. 2019. Форма участі – очна, усна доповідь.

5. 5th Annual International Remote Conference Science and Society. Canada. Feb. 15-16, 2020. P.109-110. Форма участі - дистанційна, постерна доповідь.

6. ESHG Conference, Vienna, Austria. June 11-14. 2022. E-P16-007. Форма участі – очна, постерна доповідь.