

**ДОКШУКИНА АЛИНА АЛЕКСЕЕВНА**

**ОПТИМИЗАЦИЯ ДИАГНОСТИКИ МОНОГЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ,  
ПРОЯВЛЯЮЩИХСЯ ХОЛЕСТАЗОМ В ПЕРИОД НОВОРОЖДЕННОСТИ**

3.1.21. - Педиатрия

1.5.7. - Генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научные руководители:**

**Дегтярева Анна Владимировна**, доктор медицинских наук, профессор;

**Шубина Екатерина**, кандидат биологических наук

**Официальные оппоненты:**

**Сурков Андрей Николаевич** – доктор медицинских наук; Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», заведующий отделением гастроэнтерологии для детей Научно-клинического центра № 2 Научно-исследовательского института педиатрии и охраны здоровья детей;

**Семенова Наталья Александровна** – кандидат медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», ведущий научный сотрудник, врач-генетик

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное автономное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 года в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета по защите докторских и кандидатских диссертаций 21.1.025.01, созданного на базе Федерального Государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачёва» Министерства Здравоохранения Российской Федерации по адресу: 117997, Москва, ул. Саморы Машела, дом 1.

С диссертацией можно ознакомиться в Федеральном Государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачёва» Министерства Здравоохранения Российской Федерации по адресу: 117997, Москва, ул. Саморы Машела, дом 1 и на сайте [www.fnkc.ru](http://www.fnkc.ru)

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор медицинских наук

**Жуков Николай Владимирович**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Холестаза может быть вызван широким спектром состояний: перинатальные инфекции, врожденные аномалии гепато-билиарной системы, эндокринопатии, перинатальная асфиксия и парентеральное питание (Ananth et al., 2018; Lurz B. et al., 2021).

Синдром холестаза в первые 3 месяца жизни называют неонатальным холестазом (НХ) (Дегтярева А. В. и др., 2021; Choi, H. J. et al., 2022). Частота НХ составляет около 1 на 2500 живорождений. Одной из ведущих причин НХ является билиарная атрезия (БА) (35–41%) (Boster M. et al., 2019; Brahee L. et al., 2022; Razumovskiy et al., 2019). Существенная доля заболеваний, проявляющихся неонатальным холестазом представлена генетически детерминированными моногенными, в том числе метаболическими заболеваниями.

Моногенные заболевания с неонатальным холестазом – это крайне гетерогенная группа с широким диапазоном клинических и лабораторных проявлений (Ревнова М. О. и др., 2019; Benchimol E. I. et al., 2009). Дифференциальная диагностика моногенных заболеваний с НХ имеет исключительное важное значение, так как эффективность лечения часто зависит от возраста и сроков постановки диагноза (Götze et al., 2015; Lee et al., 2009). В настоящее время опубликовано небольшое количество работ, посвященных сравнению клинико-лабораторных показателей при разных нозологиях с неонатальным холестазом, а отсутствие унифицированных алгоритмов дифференциальной диагностики приводит к несвоевременному выявлению заболевания и лечению (Fawaz и др., 2017). Детальное описание клинической картины и лабораторных параметров в раннем возрасте у детей с уже подтвержденным генетически диагнозом является актуальным и необходимым шагом к повышению эффективности ранней диагностики.

Развитие молекулярно-генетических технологий способствовало выявлению новых генетических причин неонатального холестаза, что привело к значительному снижению числа состояний, ранее классифицируемых как идиопатический неонатальный холестаз (Almes et al., 2022; Jeyaraj et al., 2021; Maddirevula et al., 2019). Совершенствование и удешевление метода NGS (next generation sequencing, секвенирование нового поколения) позволяет в короткие сроки проводить расширенное исследование ДНК пациентов с использованием генетических панелей с набором генов, ответственных или участвующих в развитии НХ (дают возможность целенаправленно и быстро подтвердить предполагаемый диагноз), полноэкзомное секвенирование ДНК (WES-whole exome sequencing) при отрицательных или неоднозначных результатах панели, полногеномное секвенирование (WGS – whole genome sequencing). Благодаря такому диагностическому инструменту как NGS доля идентифицируемых генетических причин у пациентов с неонатальным холестазом будет расти, как и количество

описанных клинически значимых вариантов.

Однако, на данный момент не существует общепринятого алгоритма выбора молекулярно-генетических исследований, так как у каждого метода есть достоинства и ограничения (Mahmud et al., 2022; Nicastro et al., 2019). Применительно к моногенным заболеваниям, сопровождающимся неонатальным холестазом, нет однозначного мнения, какой метод является приоритетным, что определяет актуальность выбранной темы. Единичные исследования демонстрируют сравнительный анализ эффективности различных молекулярно-генетических тестов (Bellomo-Brandao et al., 2009; Fawaz et al., 2017; Götze et al., 2015; Lee et al., 2009; Takeda et al., 2021).

Таким образом, ранняя диагностика моногенных заболеваний, сопровождающихся неонатальным холестазом, является важной и актуальной проблемой, решение которой позволит поставить диагноз, определить необходимость дополнительных исследований для пациента и/или его семьи и своевременно начать лечение, что, несомненно, улучшит прогноз, а также провести пренатальную диагностику при последующих беременностях или использовать вспомогательные репродуктивные технологии с предимплантационной диагностикой.

#### **Степень разработанности темы исследования**

Неонатальный холестаз может быть вызван широким спектром заболеваний, из которых около 40% представлены генетически детерминированными состояниями (Fischler L. et al., 2014; Gunaydin et al., 2019). Несмотря на различные патогенетические механизмы и структурные изменения в белках генов-мишеней, для большинства патологий характерны схожие клинико-лабораторные и инструментальные признаки, что существенно затрудняет дифференциальную диагностику моногенных заболеваний с НХ и, как следствие, удлиняет сроки начала возможной патогенетической терапии (Gunaydin et al., 2019; Jeyaraj et al., 2021; Mahmud et al., 2022; Ranucci et al., 2022). Результаты таких исследований могут помочь в ранней дифференциальной диагностике моногенных заболеваний, сопровождающихся холестазом, и сузить круг поиска при биоинформатическом анализе, что, в свою очередь, ускоряет постановку диагноза. Особенный интерес представляют наиболее часто встречающиеся синдром Алажилля (СА) и прогрессирующий семейный внутрипеченочный холестаз 1-го и 2-го типов (ПСВХ 1-го и 2-го типов), так как относительно недавно был зарегистрирован препарат для лечения кожного зуда у данной категории пациентов.

На сегодняшний день не подвергается сомнению значимость молекулярно-генетических методов в клинической практике (Nicastro et al., 2019; Togawa et al., 2016).

Однако работы зарубежных коллег показывают крайне широкий спектр диагностических алгоритмов, которые включают сложный и неоднозначный порядок выбора

метода исследования. В этой связи определение диагностической значимости молекулярно-генетических тестов у детей раннего возраста с НХ представляет собой необходимый шаг на пути к формированию оптимального алгоритма выбора метода исследования.

### **Цель исследования**

Оптимизировать алгоритм дифференциальной диагностики моногенных заболеваний с неонатальным холестазом, основанный на оценке клиничко-лабораторных, инструментальных и молекулярно-генетических данных в первые 3 месяца жизни

### **Задачи исследования**

1. Выявить ключевые клиничко-лабораторные и инструментальные признаки у детей с неонатальным холестазом в первые 3 месяца жизни при генетически подтвержденных моногенных заболеваниях.

2. На основании сравнительного анализа клиничко-лабораторных и инструментальных изменений установить дифференциально-диагностические признаки при часто встречающихся заболеваниях: синдром Алажилля, прогрессирующий семейный внутрипеченочный холестаз 1-го и 2-го типов, дефицит альфа-1-антитрипсина в первые 3 месяца жизни.

3. Определить диагностическую эффективность молекулярно-генетических методов (панель генов, полноэкзомное секвенирование, хромосомный микроматричный анализ) при моногенных заболеваниях с неонатальным холестазом.

4. Оптимизировать и внедрить в клиническую практику алгоритм дифференциальной диагностики моногенных заболеваний, проявляющихся неонатальным холестазом.

### **Научная новизна**

Впервые установлено, что в первые 3 месяца жизни у 21% детей с синдромом Алажилля отмечается менее 3 признаков, необходимых для постановки диагноза, у 14% детей выявлены изменения, характерные для билиарной атрезии.

Впервые показано, что в первые 3 месяца жизни у 13% детей с дефицитом альфа-1-антитрипсина и у 31% детей с редкими формами моногенных заболеваний с неонатальным холестазом выявляется клиничко-лабораторный и инструментальный симптомокомплекс, характерный для билиарной атрезии.

При проведении полноэкзомного секвенирования впервые выявлен новый патогенный генетический вариант в гене *UNC45A*, который ассоциирован с остеоотогепатоэнтеральным синдромом.

При проведении полноэкзомного секвенирования выявлено 23 новых ранее не описанных генетических варианта в генах *TJP2*, *MPB17*, *JAG1*, *AKR1D1*, *SPTA1*, *GPI*, *KIF12*, *NBAS*, *SPTB*, *CLDN1*.

Полученные результаты полноэкзомного секвенирования с ранее не описанными генетическими вариантами внесены в соответствующие мировые базы с учетом подтвержденной патогенности.

### **Теоретическая и практическая значимость исследования**

Определены ключевые клинико-лабораторные и инструментальные параметры у детей с неонатальным холестазом.

Определена тактика выбора молекулярно-генетических методов при дифференциальном поиске у детей с неонатальным холестазом.

Разработан алгоритм клинико-лабораторного и инструментального обследования детей с неонатальным холестазом, который позволит проводить оценку необходимых показателей в полном объеме и оптимизировать клиническую информацию для биоинформатического поиска.

Разработан и внедрен в клиническую практику алгоритм дифференциальной диагностики моногенных заболеваний с неонатальным холестазом.

Подготовлены методические рекомендации по диагностике и ведению детей с синдромом Алажилля для практикующих врачей.

### **Методология и методы исследования**

В исследование вошло 188 детей с неонатальным холестазом, из них с подтвержденными генетическими заболеваниями 120: 64 ребенка с синдромом Алажилля, 19 детей с прогрессирующим семейным внутрипеченочным холестазом (ПСВХ) 1-го и 2-го типов, 19 детей с дефицитом альфа-1-антитрипсина (ДА1АТ), а также дети с другими формами моногенных заболеваний ( $n = 18$ ) с неонатальным холестазом, такими как галактоземия ( $n = 1$ ), синдром Цельвегера ( $n = 1$ ), болезнь Ниманна – Пика тип С ( $n = 1$ ), неонатальный склерозирующий холангит ( $n = 2$ ), врожденное нарушение синтеза желчных кислот ( $n = 2$ ), гемолитическая анемия с дефицитом глюкозофосфатизомеразы ( $n = 1$ ), синдром деплеции митохондриальной ДНК тип 6 ( $n = 1$ ), остеоотогепатоэнтеральный синдром ( $n = 1$ ), прогрессирующий семейный внутрипеченочный холестаз 4-го типа ( $n = 2$ ), прогрессирующий семейный внутрипеченочный холестаз 8-го типа ( $n = 1$ ), синдром Дубина-Джонсона ( $n = 1$ ), младенческая печеночная недостаточность ( $n = 1$ ), ихтиоз со склерозирующим холангитом ( $n = 1$ ), сфероцитоз 2-го и 3-го типов ( $n = 2$ ).

В анализ лабораторных данных были включены биохимические маркеры, а также показатели коагулограммы. У всех детей проводилась оценка результатов комплексного ультразвукового обследования органов брюшной полости, почек и сердца в первые 3 месяца жизни. Молекулярно-генетические исследования включали исследование гена *JAG1* с

использованием секвенирования по Сэнгеру; NGS секвенирование панели из 52 генов и секвенирование полного экзона, генома, а также хромосомный микроматричный анализ.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. В первые 3 месяца жизни у 14% детей с синдромом Алажилля, у 13% детей с дефицитом альфа-1-антитрипсина и у 31,2% пациентов с другими редкими моногенными заболеваниями с неонатальным холестазом выявлены клинико-лабораторные и инструментальные признаки билиарной атрезии. Все классические клинические критерии синдрома Алажилля отмечались только у 10% детей, а у 21,4% детей было менее 3 признаков, необходимых для постановки диагноза. При прогрессирующем семейном внутривнутрипеченочном холестазе 1-го и 2-го типов холестаз сопровождался повышением желчных кислот крови и в 67% случаев манифестацией кожного зуда, а также нормальным уровнем гамма-глутамилтрансферазы (ГГТ) и холестерина. Только при 25% других редких моногенных формах холестаза выявлены специфические лабораторные маркеры.

2. При сравнительном анализе синдрома Алажилля, дефицита альфа-1-антитрипсина и прогрессирующего семейного внутривнутрипеченочного холестаза (ПСВХ) 1-го и 2-го типов ключевыми лабораторными показателями явились уровень ГГТ, холестерина и желчных кислот. Активность ГГТ и уровень холестерина был достоверно выше при синдроме Алажилля, чем при дефиците альфа-1-антитрипсина, тогда как при ПСВХ 1-го и 2-го типов данные показатели оставались в пределах нормы. При синдроме Алажилля чаще отмечались аномалии других органов и задержка внутриутробного развития.

3. Доля выявленных моногенных заболеваний с неонатальным холестазом с использованием секвенирования полного экзона была значимо выше, чем при секвенировании панели генов (25% против 9%). У 2% пациентов с клиническими критериями синдрома Алажилля диагноз был установлен при проведении хромосомного микроматричного анализа, выявившего делецию 20p12.2.

### **Степень достоверности и апробация результатов исследования**

Достоверность результатов данного исследования подтверждается количеством пациентов, включенных в исследование (188), использованием молекулярно-генетических методов, а также методами статистической обработки данных.

Основные положения диссертации и результаты работы представлены и доложены на XIV, XV и XVI Всероссийских образовательных конгрессах «Анестезия и реанимация в акушерстве и неонатологии» (Москва, 2021, 2022, 2023); XIV, XV и XVI Региональном научно-образовательном форуме «Мать и Дитя» и Пленуме Правления РОАГ (2021, 2022, 2023); Шестой и Седьмой Международных научно-практических конференции «NGS в медицинской генетике 2022», «NGS в медицинской генетике 2024»; IV Всероссийском

научно-практическом конгрессе с международным участием «Орфанные болезни» (2022); Гастронеделе Российской Гастроэнтерологической ассоциации (2023).

Апробация работы проведена на заседании апробационной комиссии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России (протокол № 2 от 29 марта 2024 г).

#### **Личный вклад автора**

Автор лично принимал непосредственное участие в организации и проведении лечебно-диагностических мероприятий, сформулировал цель, задачи, дизайн исследования и этапы выполнения работы, осуществлял сбор первичных клинико-лабораторных данных, проводил обработку, анализ, интерпретацию и обсуждение полученных результатов. Исследователем проведен ретроспективный анализ медицинской документации и проспективное исследование согласно намеченному плану обследования и динамического наблюдения за детьми. Автор лично принимал участие в обследовании и лечении детей, проспективно включенных в настоящее исследование. Также автор лично определял необходимость проведения того или иного молекулярно-генетического исследования, интерпретировал полученные данные, проводил валидацию результатов.

#### **Внедрение результатов исследования в практику**

Результаты научно-исследовательской работы внедрены в клиническую работу отдела педиатрии Института неонатологии и педиатрии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России и Медико-генетической консультации, отделения патологии новорожденных и недоношенных детей, отделения реанимации и интенсивной терапии новорожденных Перинатального центра БУЗ УР «Первая республиканская клиническая больница МЗ УР».

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

Диссертационное исследование соответствует паспорту научной специальности 3.1.21. Педиатрия; группа научных специальностей – клиническая медицина. Результаты исследования соответствуют областям исследования специальности, а именно пунктам 3 и 5. Диссертационное исследование соответствует паспорту научной специальности 1.5.7. Генетика; группа научных специальностей – клиническая медицина. Результаты исследования соответствуют областям исследования специальности, а именно пунктам 16, 19, 23, 24.

### **Публикации результатов исследования**

По теме диссертации опубликовано 5 научных работ, из них 4 в журналах, включенных в перечень изданий, рекомендованных ВАК РФ для публикаций основных результатов диссертационных исследований.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 135 страницах, состоит из введения, четырех глав, выводов, практических рекомендаций, указателя литературы, включающего 15 отечественных и 139 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 23 рисунками, 30 таблицами.

### **Благодарности**

Автор выражает глубокую благодарность научным руководителям, заведующей отдела педиатрии института неонатологии и педиатрии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России, д. м. н., профессору А. В. Дегтяревой, за помощь, поддержку и ценные рекомендации; заведующей лаборатории анализа геномных данных института репродуктивной генетики ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова», к.б.н. Е. Шубиной за помощь в решении нестандартных задач. За помощь в организации обследований пациентов директору института репродуктивной генетики ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова», члену корреспонденту РАН, д.б.н., профессору Д.Ю. Трофимову, заведующей отделом ультразвуковой диагностики в неонатологии и педиатрии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова», к.м.н. Е.А. Филипповой, а также всем сотрудникам отдела педиатрии института неонатологии и педиатрии и института репродуктивной генетики ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова».

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Обзор литературы**

В обзоре представлены 3 раздела, включающие всесторонний анализ отечественной и зарубежной литературы по генетическим аспектам неонатального холестаза. В этих разделах проведено детальное описание клинико-лабораторных и инструментальных характеристик моногенных заболеваний с неонатальным холестазом, представлены механизмы патогенеза этих заболеваний, а также широкий спектр молекулярно-генетических методов и их применение в мировой клинической практике.

### **Материалы и методы исследования**

Работа выполнена в ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России (директор – академик РАН, д. м. н., профессор Г. Т. Сухих). Ведение детей осуществлялось в отделе педиатрии Института неонатологии и педиатрии (заведующая отделом – д. м. н.,

профессор А. В. Дегтярева), генетические методы исследования проводились в институте репродуктивной генетики «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» (руководитель – член корреспондент РАН, д. б. н., профессор Д. Ю. Трофимов), лаборатории анализа геномных данных (руководитель – к. б. н. Е. Шубина) института репродуктивной генетики «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова», лаборатории наследственных болезней обмена веществ ФГБНУ «МГНЦ им. Н. П. Бочкова» (заведующая лабораторией – д. м. н., Е. Ю. Захарова).

В исследование вошло 188 детей с неонатальным холестазом, из них 120 детей с подтвержденными генетическими заболеваниями (Таблица 1).

Таблица 1 – Дети с моногенными заболеваниями, вошедшие в исследование

<i>Заболевание (ОМIM)</i>	<i>Количество пациентов (n)</i>	<i>Частота встречаемости</i>
Синдром Алажилля (118450)	64	1:70000–100000
ПСВХ 1-го типа (211600)	6	1:50000–100000
ПСВХ 2-го типа (601847)	13	1:50000–100000
ПСВХ 4-го типа (170060)	2	–
ПСВХ 8-го типа (619662)	1	–
Дефицит альфа-1-антитрипсина (613490)	19	1:1500–5000
Галактоземия (230400)	1	1:16000
Синдром Цельвегера (614859)	1	1:50000–100000
Болезнь Нимана – Пика тип С (257220)	1	1:150000
Неонатальный склерозирующий холангит (617394)	2	–
Врожденное нарушение синтеза желчных кислот (235555)	2	2:1000000
Гемолитическая анемия с дефицитом глюкозофосфатизомеразы (613470)	1	1:1000000
Синдром деплеции митохондриальной ДНК тип 6 (612075)	1	–
Остеоотогепатоэнтеральный синдром (619377)	1	–
Синдром Дубина – Джонсона (237500)	1	1:1300
Младенческая печеночная недостаточность (616483)	1	–
Ихтиоз со склерозирующим холангитом (607726)	1	–
Сфероцитоз 2-го типа (616649)	1	1:2000–5000
Сфероцитоз 3-го типа (270970)	1	1:2000–5000

*Критерии включения для всех участников исследования:* дети с моногенными заболеваниями с неонатальным холестазом; информированное согласие родителей на включение в исследование.

*Критерии исключения для всех участников исследования:* дети с подтвержденной хирургической патологией (билиарная атрезия, киста холедоха, билиарный сладж и др.); дети с другими заболеваниями печени.

У законных представителей детей были взяты письменные информированные добровольные согласия на участие в исследовании. Данное клиническое исследование одобрено комиссией по этике биомедицинских исследований (протокол № 13 от 09 декабря 2021 года) ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России и утверждено Ученым советом ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России (протокол № 8 от 13 мая 2022 года).

Для решения первой задачи был проведен ретроспективный анализ историй болезни 118 пациентов с подтвержденным моногенным заболеванием, сопровождающимся неонатальным холестазом. Для 2 пациентов была недостаточно представлена медицинская документация о первых 3 месяцах жизни (Рисунок 1). Проанализированы клинические проявления заболеваний (особенности фенотипа, физическое развития, антропометрические показатели при рождении, ГВ, ЗВУР, размеры печени и селезенки, характер стула, желтуха, зуд), данные лабораторно-инструментальных исследований (синтетическая функция печени: альбумин, ХЭ, фибриноген, ПТИ, МНО; синдром холестаза: уровень общего и прямого билирубина, ЩФ, ГГТ, ХС, ЖК, ТГ; синдром цитолиза: уровень АЛТ, АСТ), а также результаты ультразвукового исследования органов брюшной полости и почек в первые три месяца жизни.

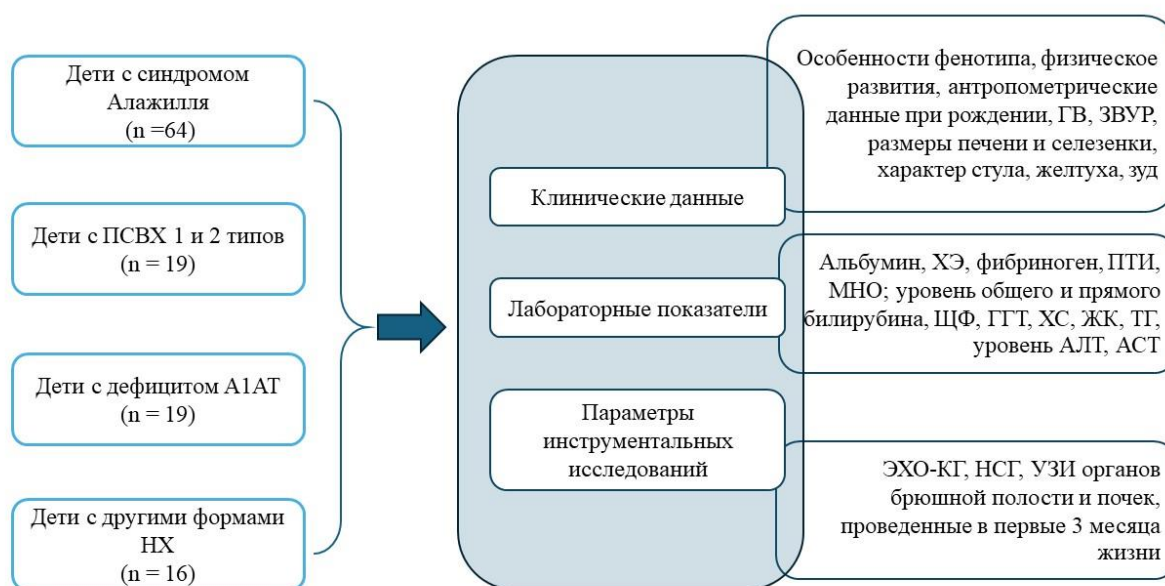


Рисунок 1 - Дизайн I задачи исследования

Для решения 2-й задачи был проведен ретроспективный анализ и сравнение результатов раннего клинико-лабораторного и инструментального обследования при наиболее распространенных моногенных заболеваниях с неонатальным холестазом (синдром Алажилля, ПСВХ 1-го и 2-го типов, дефицит альфа-1-антитрипсина) в первые 3 месяца жизни. Проводилось определение диагностически значимых клинико-лабораторных и ультразвуковых изменений в первые три месяца жизни у детей при наиболее распространенных моногенных заболеваниях с неонатальным холестазом (Рисунок 2).



Рисунок 2 - Дизайн II задачи исследования

Для решения третьей задачи проспективно проводилось молекулярно-генетическое обследование у 100 пациентов с недифференцированным синдромом холестаза (68 пробандам при проведении исследований диагноз установлен не был, в связи с чем в данном исследовании их клинико-лабораторные и инструментальные параметры не оценивались; показатели первых 3 месяцев жизни 32 пробандов оценивались при решении 1-й и 2-й задач) (Рисунок 3): секвенирование панели генов, ассоциированных с холестазом, полного экзома, полного генома и хромосомный микроматричный анализ. Для подтверждения трансположения и валидации полученных на разных этапах генетических вариантов использовалось секвенирование по Сэнгеру. 62 пациентам проведено секвенирование панели генов и полного экзома, из них 8 также проводилось полногеномное секвенирование и 6 – хромосомный микроматричный анализ; 13 пациентам – только секвенирование панели генов и 25 – только секвенирование полного экзома.

Для решения четвертой задачи были проанализированы результаты сравнительного анализа клинико-лабораторных и инструментальных показателей при моногенных

заболеваниях с НХ, а также результаты оценки эффективности проводимых молекулярно-генетических методов. Оптимизирован алгоритм дифференциальной диагностики моногенных заболеваний с НХ.



Рисунок 3 – Пациенты, вошедшие в исследование

Статистический анализ и визуализация полученных данных проводились с использованием среды для статистических вычислений R 4.3.1 (R Foundation for Statistical Computing, Вена, Австрия). Описательные статистики для категориальных переменных представлены в виде абсолютной и относительной частот, в виде медианы (1-й и 3-й квартили) – для количественных. Поскольку распределение уровня большинства исследованных показателей не было нормальным, а групповые дисперсии не были равны, различия между группами определяли с помощью непараметрического теста Краскела – Уоллиса, а при обнаружении статистически значимых различий проводили парные сравнения с применением непараметрического теста Манна – Уитни, в отношении категориальных показателей – точный тест Фишера. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ , высокодостоверными при  $p < 0,01$ .

### Результаты исследования и их обсуждение

**Клинико-лабораторные и инструментальные характеристики пациентов с генетически подтвержденными моногенными заболеваниями, проявляющимися холестазом.** Нами проведен анализ клинико-лабораторных и инструментальных показателей у 118 детей с генетически подтвержденными моногенными заболеваниями (Рисунок 4) в первые 3 месяца жизни: 64 ребенка с синдромом Алажилля, 19 детей с ПСВХ 1 и 2 типов, 19 детей с ДА1АТ, а также редкие формы моногенных заболеваний ( $n = 16$ ) с неонатальным холестазом, такие как синдром Цельвегера ( $n = 1$ ), болезнь Ниманна – Пика тип С ( $n = 1$ ),

неонатальный склерозирующий холангит (n = 2), врожденное нарушение синтеза желчных кислот (n = 2), гемолитическая анемия с дефицитом глюкозофосфатизомеразы (n = 1), синдром деплеции митохондриальной ДНК тип 6 (n = 1), прогрессирующий семейный внутрипеченочный холестаз 4-го типа (n = 1), прогрессирующий семейный внутрипеченочный холестаз 8-го типа (n = 1), галактоземия (n = 1), синдром Дубина-Джонсона (n = 1), младенческая печеночная недостаточность (n = 1), ихтиоз со склерозирующим холангитом (n = 1), сфероцитоз 2-го и 3-го типов (n = 2).

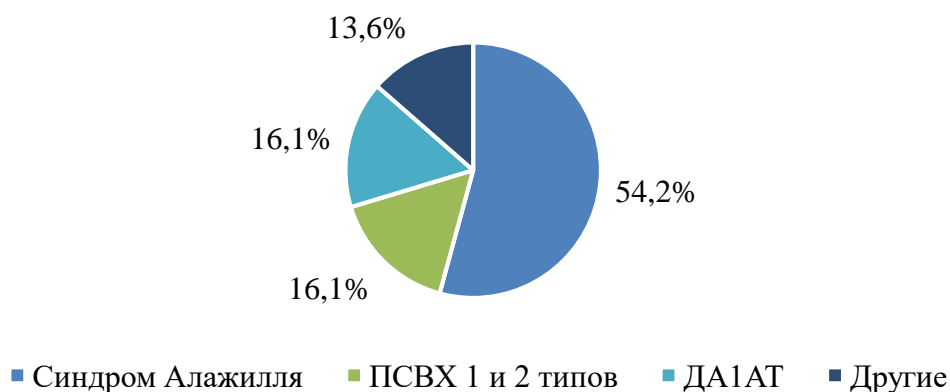


Рисунок 4 – Структура моногенных заболеваний, проявляющихся неонатальным холестазом

#### *Синдром Алажилля*

Наиболее частым проявлением синдрома Алажилля является поражение печени. При этом у 40% детей в первые 3 месяца жизни отмечались нормальные размеры печени и лишь у 12,5% пациентов был отмечен кожный зуд.

У всех пациентов отмечалось значимое повышение уровня ГГТ и холестерина (Таблица 2). У 14% пациентов выявлены клиничко-лабораторные и ультразвуковые признаки билиарной атрезии (постоянная ахолия стула, повышение активности ГГТ, отсутствие визуализации желчного пузыря, либо гипоплазия желчного пузыря, симптом «треугольного рубца» при УЗИ). У 50% доношенных детей отмечалась ЗВУР. Среди других характерных аномалий у 80% пациентов в первые 3 месяца жизни были выявлены пороки сердца, у 75% – особенности лицевого фенотипа, у 55,4% – изменения почек, аномалии строения позвоночника – у 48% и глаз – у 34%.

Таблица 2 – Лабораторные данные пациентов с синдромом Алажилля в возрасте до 3 месяцев жизни

<i>Параметры</i>	<i>Me (LQ; UQ)</i>	<i>Норма</i>
Билирубин общий, Мкмоль/л	186 (142; 253,5)	3,4–21
Билирубин прямой, Мкмоль/л	112 (84,8; 140,4)	0–5,5
ГГТ, Ед/л	633,1 (398; 983,5)	9–64
ЩФ, Ед/л	604 (433,5; 974,5)	50–360

Продолжение таблицы 2

Холестерин, Ммоль/л	7,2 (5; 9,3)	3,1–5,2
ТГ, Ммоль/л	2,2 (1,5; 3)	0,7–1,7
ЖК*, Мкмоль/л	122,5 (90;167)	0–10
АЛТ, Ед/л	196 (127,2; 289)	0–40
АСТ, Ед/л	243 (165; 331)	0–40
ПТИ**, %	96 (85; 109,7)	77–125
МНО**	1 (1; 1,1)	0,8–1,2
Общий белок, г/л	60 (57,5; 66,5)	44–76
Альбумин, г/л	40 (38; 43,1)	35–50
ХЭ, Ед/л	5949 (5444,5; 8021)	3930–10800
Фибриноген, г/л	3 (2,7; 4)	1,7–3,7
<i>Примечание</i> – * – исследовались у 15 пациентов; ** – показатели ПТИ и МНО указаны на фоне проводимой терапии препаратом витамина К		

Только у 10% детей в первые 3 месяца жизни было выявлено 6 классических клинических критериев (для постановки диагноза необходимо не менее 3). И у 21,4% детей отмечалось менее 3 классических критериев (Рисунок 5).

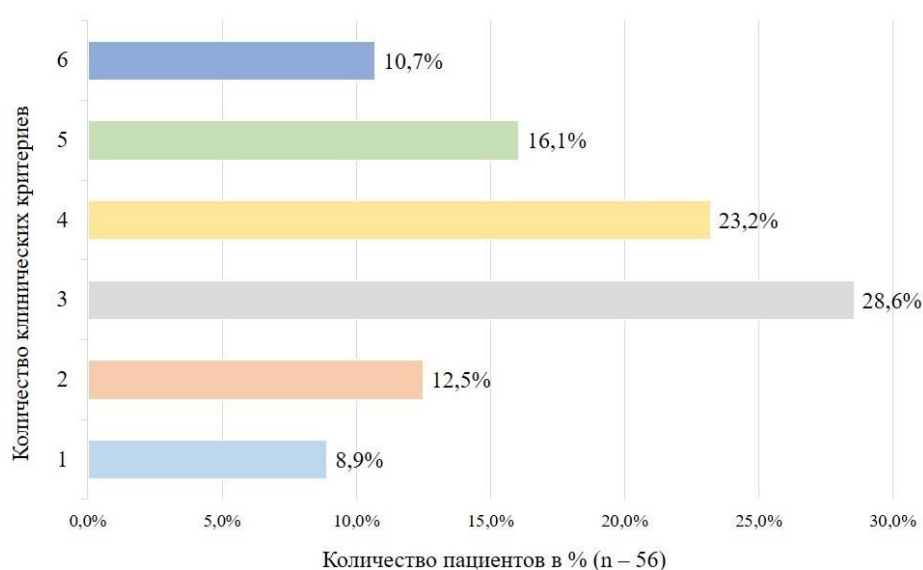


Рисунок 5 – Доли пациентов с синдромом Алажилля с учетом вовлеченности органов при постановке клинического диагноза. Оценивались все классические клинические критерии за исключением сосудистых мальформаций

Среди представленной выборки у 52 пациентов (95,8%) выявлены мутации в гене *JAG1*, у 2 пациентов (3,6%) – в гене *NOTCH2* и у 2 пациентов выявлены делеции участка 20 хромосомы с вовлечением гена *JAG1*.

Таким образом, при подозрении на билиарную атрезию, а также при синдроме холестаза у пациента в отсутствие других клинических признаков, нельзя исключить синдром Алажилия, что требует проведения подтверждающей генетической диагностики.

*Прогрессирующий семейный внутрипеченочный холестаз 1-го и 2-го типов*

У 67% пациентов в первые 3 месяца жизни выявлен кожный зуд с повышением сывороточного уровня желчных кислот. Важно отметить, что для данной группы характерной особенностью явились нормальные уровни ГГТ и холестерина, наряду с повышением других биохимических маркеров холестаза (Таблица 3).

Таблица 3 – Лабораторные данные пациентов с ПСВХ 1 и 2 типов в возрасте до 3 месяцев жизни

<i>Параметр</i>	<i>Me (LQ; UQ)</i>	<i>Норма</i>
Билирубин общий, Мкмоль/л	136,9 (100; 235,8)	3,4–21
Билирубин прямой, Мкмоль/л	93 (60,6; 128)	0–5,5
ГГТ, Ед/л	40,5 (33,8; 57,2)	9–64
ЩФ, Ед/л	653 (538,9; 1322,5)	50–360
Холестерин, Ммоль/л	5,2 (4,8; 5,6)	3,1–5,2
ТГ, Ммоль/л	2,5 (1,9; 3,6)	0,7–1,7
АЛТ, Ед/л	299,8 (124; 552,2)	0–40
АСТ, Ед/л	228,3 (158; 478,5)	0–40
ПТИ, %	91 (86,8; 106,2)	77–125
МНО	1 (1; 1,1)	0,8–1,2
Общий белок, г/л	60 (54,3; 65,7)	44–76
Альбумин, г/л	39,9 (39,1; 40,5)	35–50
ХЭ, Ед/л	7380,3 (6001,1; 7603,1)	3930–10800
Фибриноген, г/л	2,5 (2,2; 3,3)	1,7–3,7
Желчные кислоты, мкмоль/л	203,4 (152–258)	0–10

Среди исследуемой выборки 31,5% генетических находок выявлено в гене *ATV8B1*, что ассоциировано с прогрессирующим семейным внутрипеченочным холестазом 1-го типа, а 68,5% – в гене *ABC11*, что соответствует ПСВХ 2-го типа.

Характерных пороков и аномалий развития других органов и систем, а также специфических особенностей фенотипа не выявлено. Кроме того, в группе детей с ПСВХ не было отмечено клинико-лабораторных и инструментальных признаков билиарной атрезии.

*Дефицит альфа-1-антитрипсина*

У всех детей с ДА1АТ в первые 3 месяца жизни отсутствовал кожный зуд. Также у всех

детей было выявлено снижение уровня альфа-1-антитрипсина в крови. По данным клинко-лабораторного и инструментального обследования у 2/15 (13%) выявлены характерные для билиарной атрезии УЗ-признаки «фиброзной площадки» и повышение активности ГГТ (Таблица 4).

Таблица 4 – Лабораторные данные пациентов с ДА1АТ в возрасте до 3 месяцев жизни

<i>Параметр</i>	<i>Me (LQ; UQ)</i>	<i>Норма</i>
Билирубин общий, Мкмоль/л	160,1 (108; 201,2)	3,4–21
Билирубин прямой, Мкмоль/л	88 (57,1; 100,8)	0–5,5
ГГТ, Ед/л	379,5 (247,2; 551,8)	9–64
ЩФ, Ед/л	623 (340; 851,2)	50–360
Холестерин, Ммоль/л	6,6 (5,8; 7,7)	3,1–5,2
ТГ, Ммоль/л	1,5 (1,3; 2,2)	0,7–1,7
АЛТ, Ед/л	162,4 (78; 267,5)	0–40
АСТ, Ед/л	194,2 (163,2; 212,1)	0–40
ПТИ, %	88 (78,5; 91,5)	77–125
МНО	1,1 (1; 1,5)	0,8–1,2
Общий белок, г/л	56 (52,4; 56,5)	44–76
Альбумин, г/л	35 (33,2; 38,2)	35–50
ХЭ, Ед/л	5300,5 (4892,8; 5818,8)	3930–10800
Фибриноген, г/л	2 (1,9; 2,5)	1,7–3,7
Альфа-1-антитрипсин, мг/л*	0,4 (0,3; 0,7)	0,9–2,0
Примечание – * – исследование проводилось у 12 детей		

Кроме того, для ДА1АТ не отмечено характерных пороков и аномалий развития со стороны других органов и систем, а также специфических особенностей фенотипа.

У 17/19 пациентов выявлен частый вариант в гене *SERPINA1 c.1096G>A (p.Glu366Lys)* – *ZZ-фенотип* в гомозиготном состоянии. У двух пациентов аналогичные варианты выявлены при проведении полноэкзомного секвенирования.

#### *Другие редкие моногенные заболевания с НХ*

У всех пациентов в первые 3 месяца жизни отмечался синдром холестаза. У большинства детей он сочетался с желтухой 14/16 (87,5%), увеличением размеров печени 15/16 (93,8%). Более, чем у половины детей в первые 3 месяца наблюдались сниженные показатели физического развития, спленомегалия и геморрагический синдром (Рисунок 6). У половины пациентов отмечалась стойкая или преходящая ахолия стула, что также существенно усложняло диагностический поиск. Также важно отметить, что в представленной группе ни у одного пациента не было кожного зуда.

У 10/16 (62,5%) пациентов синдром холестаза сопровождался увеличением активности

ГГТ, при этом у 5/16 (31,2%) увеличение ГГТ сочеталось с ахолией стула. У большинства пациентов (15/16) отмечался синдром цитолиза разной степени выраженности. 9 детям из 16, которым проводилось исследование уровня желчных кислот в сыворотке крови, уровень ЖК был повышен. Синтетическая функция печени на выбранном этапе у представленной группы пациентов оставалась в пределах нормы.

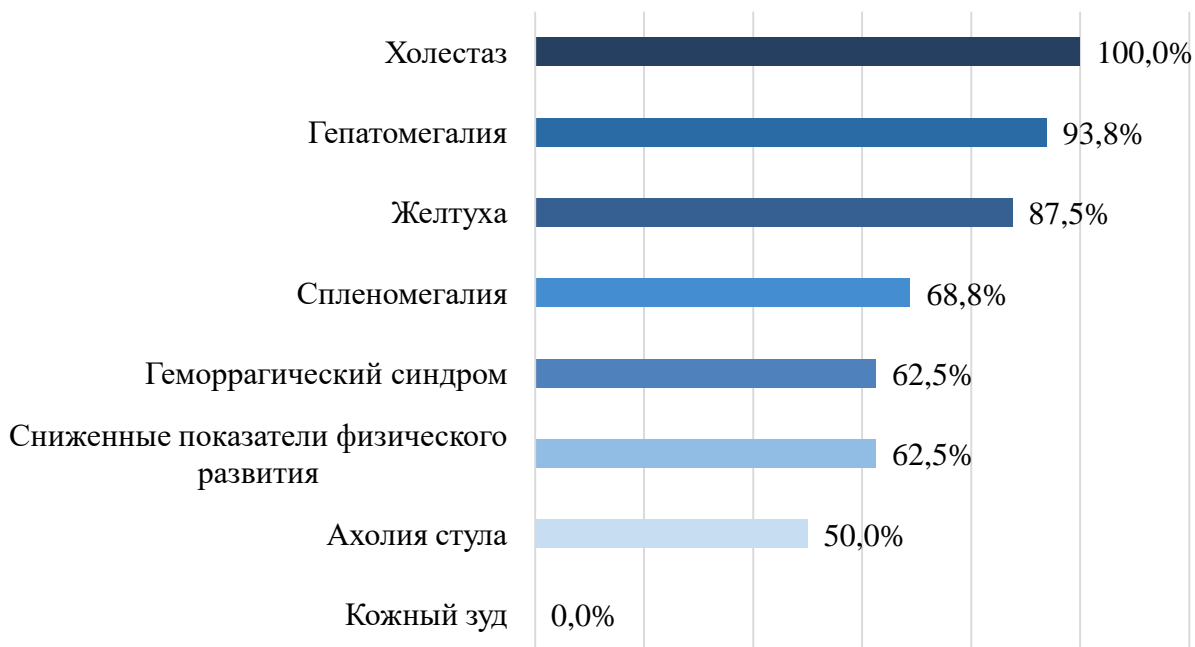


Рисунок 6 – Структура клинических проявлений пациентов с другими моногенными заболеваниями с НХ, n = 16

Среди специфических маркеров при болезни Ниманна – Пика тип С отмечается повышение хитотриазидазы 1056 нмоль/ч/мл (норма 2,5–100 нмоль/ч/мл), С-триола – 56,9 нг/мл (норма < 50), 7-кетостерола – 233,9 нг/мл (норма < 75), лизосфингомиелина 509 – 6,2 нг/мл (норма < 0,9 нг/мл), при синдроме Цельвегера выявлено повышения уровня очень длинноцепочечных жирных кислот в крови ( $\uparrow$ C26:0,  $\uparrow$ C26/C22), при врожденном нарушении синтеза желчных кислот – повышение уровня 3-оксо-дельта – 4 стероида в моче – 73,04 мкмоль/л или 96,2% аномальных ЖК (в норме < 15%).

**Сравнение ключевых клинико-лабораторных и инструментальных параметров при наиболее частых моногенных заболеваниях с неонатальным холестазом.** В рамках сравнительного анализа трех исследуемых групп определено, что наличие ЗВУР более характерно для детей с СА, чем для ПСВХ 1 и 2 типов и ДА1АТ (Таблица 5).

Таблица 5 – Сравнительный анализ клинико-anamнестических показателей в исследуемых группах

Характеристика	Синдром Алажилля	ДААТ	ПСВХ I и 2 типы	p	p Дефицит ААТ – синдром Алажилля	p ПСВХ – синдром Алажилля	p ПСВХ – Дефицит ААТ
ЗВУР	30/64 (46,8%)	2/19 (10,5%)	2/24 (8,3%)	< <b>0,001</b>	0,001	0,003	> 0,999
Гестационный возраст	38 (37; 40)	39 (38; 40)	40 (38; 40)	0,067	0,574	0,021	0,132
Масса тела при рождении	2710 (2330; 3000)	3170 (2610; 3350)	3410 (3270; 3600)	< <b>0,001</b>	0,027	< 0,001	0,089
Длина тела при рождении	49 (48; 51)	50 (48,5; 52)	52 (51; 53,5)	< <b>0,001</b>	0,132	< 0,001	0,030

Кожный зуд в первые 3 месяца жизни более характерен для детей с ПСВХ 1-го и 2-го типов (Таблица 6).

Таблица 6 – Сравнительный анализ данных параметров физикального осмотра в исследуемых группах

Характеристика	Синдром Алажилля	ДААТ	ПСВХ	p	p Дефицит ААТ – синдром Алажилля	p ПСВХ – синдром Алажилля	p ПСВХ – Дефицит ААТ
Гепатомегалия	40/56 (71,4%)	11/15 (73,3%)	15/15 (100%)	0,077	> 0,999	0,031	0,102
Спленомегалия	25/56 (45,2%)	9/15 (60%)	6/15 (40%)	0,577	0,391	0,764	0,707
Желтуха	53/56 (94,6%)	12/15 (80%)	14/15 (93,3%)	0,112	0,084	0,541	0,600
Зуд	7/56 (12,5%)	0	6/15 (40%)	<b>0,003</b>	0,331	0,011	0,006
Ахолия стула	39/56 (69,6%)	11/15 (73,3%)	12/15 (80%)	0,882	> 0,999	0,744	> 0,999

Ключевыми лабораторными показателями явились уровень ГГТ и холестерина, которые были достоверно выше при синдроме Алажилля, чем при дефиците альфа-1-антитрипсина и прогрессирующем семейном внутрпеченочном холестаза 1-го и 2-го типов (Таблица 7).

Таблица 7 – Сравнительный анализ лабораторных показателей в исследуемых группах

Параметр	Синдром Алажилля M (LQ; UQ)	ДААТ M (LQ; UQ)	ПСВХ I,2 M (LQ; UQ)	p	p ДААТ-СА	p ПСВХ-СА	p ДААТ-ПСВХ
Билирубин общий, Мкмоль/л	186 (142; 253,5)	160,1 (108; 201,2)	136,9 (100; 235,8)	0,146	0,110	0,165	0,940
Билирубин прямой, Мкмоль/л	112 (84,8; 140,4)	88 (57,1; 100,8)	93 (60,6; 128)	0,125	0,064	0,250	0,662

Продолжение таблицы 7

ГГТ, Ед/л	633,1 (398; 983,5)	379,5 (247,2; 551,8)	40,5 (33,8; 57,2)	< <b>0,001</b>	<b>0,014</b>	< <b>0,001</b>	< <b>0,001</b>
ЩФ, Ед/л	604 (433,5; 974,5)	623 (340; 851,2)	653 (538,9; 1322,5)	0,664	0,558	0,570	0,434
Холестерин, Ммоль/л	7,2 (5; 9,3)	6,6 (5,8; 7,7)	5,2 (4,8; 5,6)	<b>0,054</b>	0,454	<b>0,033</b>	<b>0,017</b>
ТГ, Ммоль/л	2,2 (1,5; 3)	1,5 (1,3; 2,2)	2,5 (1,9; 3,6)	0,111	0,079	0,431	0,076
АЛТ, Ед/л	196 (127,2; 289)	162,4 (78; 267,5)	299,8 (124; 552,2)	0,527	0,497	0,378	0,403
АСТ, Ед/л	243 (165; 331)	194,2 (163,2; 212,1)	228,3 (158; 478,5)	0,438	0,228	0,800	0,316
ПТИ, %	96 (85; 109,7)	88 (78,5; 91,5)	91 (86,8; 106,2)	0,181	0,070	0,811	0,200
МНО	1 (1; 1,1)	1,1 (1; 1,5)	1 (1; 1,1)	0,146	0,089	> 0,999	0,069
Общий белок, г/л	60 (57,5; 66,5)	56 (52,4; 56,5)	60 (54,3; 65,7)	0,009	0,002	0,699	0,089
Альбумин, г/л	40 (38; 43,1)	35 (33,2; 38,2)	39,9 (39,1; 40,5)	0,002	0,001	0,936	< 0,001
ХЭ, Ед/л	5949 (5444,5; 8021)	5300,5 (4892,8; 5818,8)	7380,3 (6001,1; 7603,1)	0,524	0,286	> 0,999	0,629
Фибриноген, г/л	3 (2,7; 4)	2 (1,9; 2,5)	2,5 (2,2; 3,3)	< <b>0,001</b>	< 0,001	0,091	0,207

По данным проведенного сравнительного анализа данных ультразвукового обследования органов брюшной полости выявлено, что изменения со стороны желчного пузыря по данным УЗИ значимо чаще выявляются при синдроме Алажилля, чем при других заболеваниях ( $p = 0,043$ ).

При синдроме Алажилля также чаще отмечаются аномалии со стороны других органов в отличие от ПСВХ 1-го и 2-го типов и ДА1АТ (Таблица 8).

Таблица 8 – Сравнительный анализ аномалий развития со стороны других органов в исследуемых группах

Характеристика	Синдром Алажилля	ДА1АТ	ПСВХ	$p$	$p$ Дефицит А1АТ – синдром Алажилль	$p$ ПСВХ – синдром Алажилль	$p$ ПСВХ – Дефицит А1АТ
ВПС	45/56 (80,3%)	1/15 (6,7%)	6/15 (40%)	< <b>0,001</b>	< 0,001	0,004	0,08
Аномалии глаз	19/56(34%)	2/15 (13,3%)	0	0,008	0,202	0,007	0,483

Продолжение таблицы 8

Аномалии скелета	22/56 (39,2%)	1/15 (6,7%)	0	< 0,001	0,027	0,003	> 0,999
Аномалии почек	31/56 (55,3%)	0	5/15 (33,3%)	< 0,001	< 0,001	0,155	0,042
Лицо	42/56 (75%)	0	0	< 0,001	< 0,001	< 0,001	> 0,999

**Результаты молекулярно-генетической диагностики.** В проспективную часть данного исследования вошло 100 детей с неонатальным холестазом. 62 пациентам проведено секвенирование панели генов и полного экзома, из них 8 также проводилось полногеномное секвенирование и 6 – хромосомный микроматричный анализ; 13 пациентам – только секвенирование панели генов и 25 – только секвенирование полного экзома (Рисунок 7).

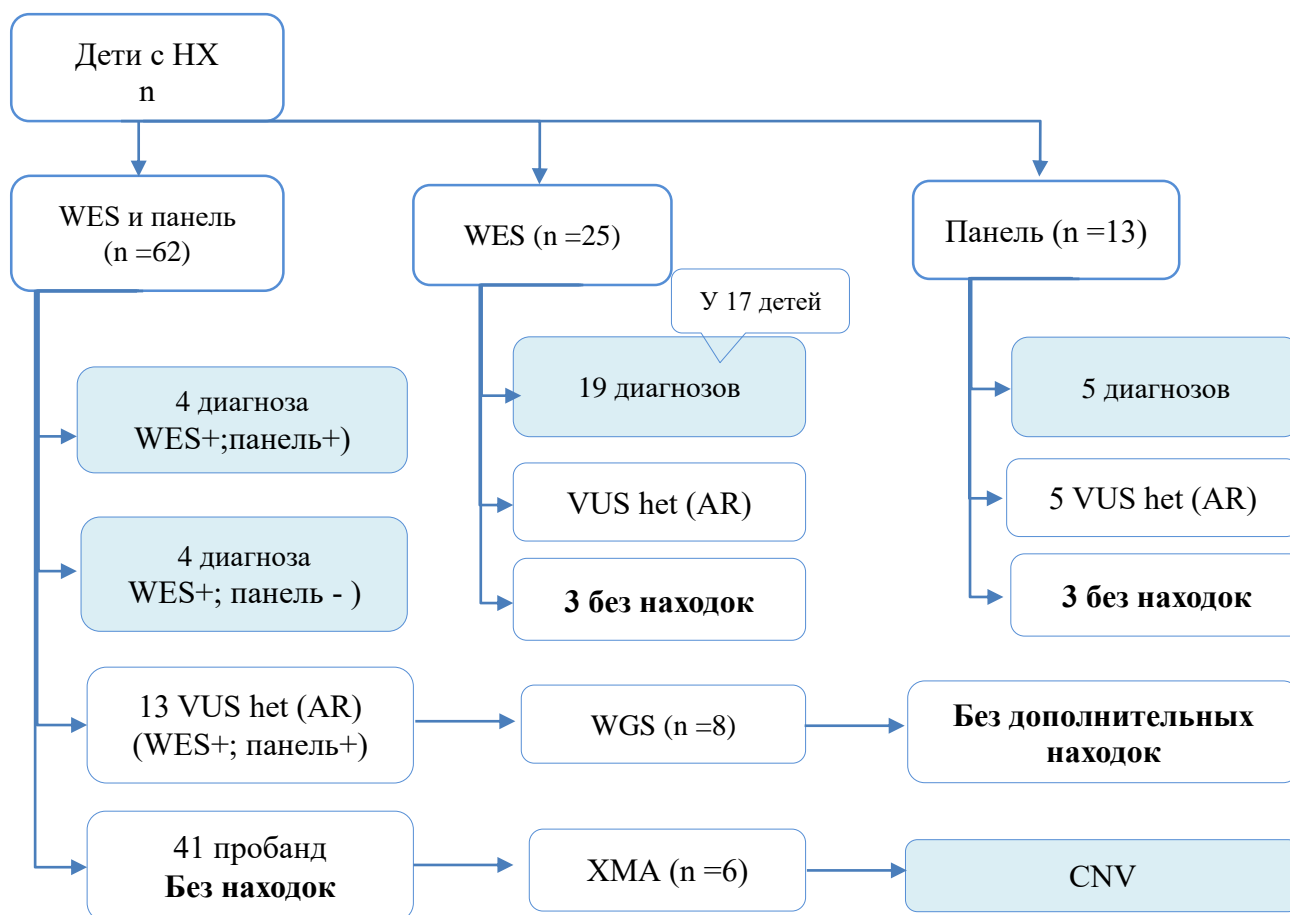


Рисунок 7 – Проведенные исследования у пробандов и генетические находки у них. WES – полноэкзомное секвенирование; WGS – полногеномное секвенирование; CNV – вариации числа копий; XMA – хромосомный микроматричный анализ, VUS – вариант с неопределенным клиническим значением

При проведении молекулярно-генетических исследований выявлено 34 ген-ассоциаций у 32/100 пробандов (32%); из них 11/34 (32%) ген-ассоциаций не входили в состав панели генов; 23/34 (67,6%) ген-ассоциации выявлены при проведении полноэкзомного

секвенирования; 6 детям с классическими клиническими критериями синдрома Аллажиля и отрицательными результатами полноэкзомного секвенирования был выполнен хромосомный микроматричный анализ, наличие делеции было подтверждено (Рисунок 8) и установлен диагноз синдром Алажилля у 2/100 (2%): у одного пробанда выявлена микроделеция на коротком плече хромосомы 20 размером 16 тыс. п. н. с вовлечением части гена *JAG1* (arr[GRCh37] 20p12.2(10649003\_10665207)x1), у второго пробанда № 54139 выявлена патогенная микроделеция на коротком плече хромосомы 20 размером более 2,5 млн. п. н. (arr[GRCh37] 20p12.2(9426080\_11976456)x1).

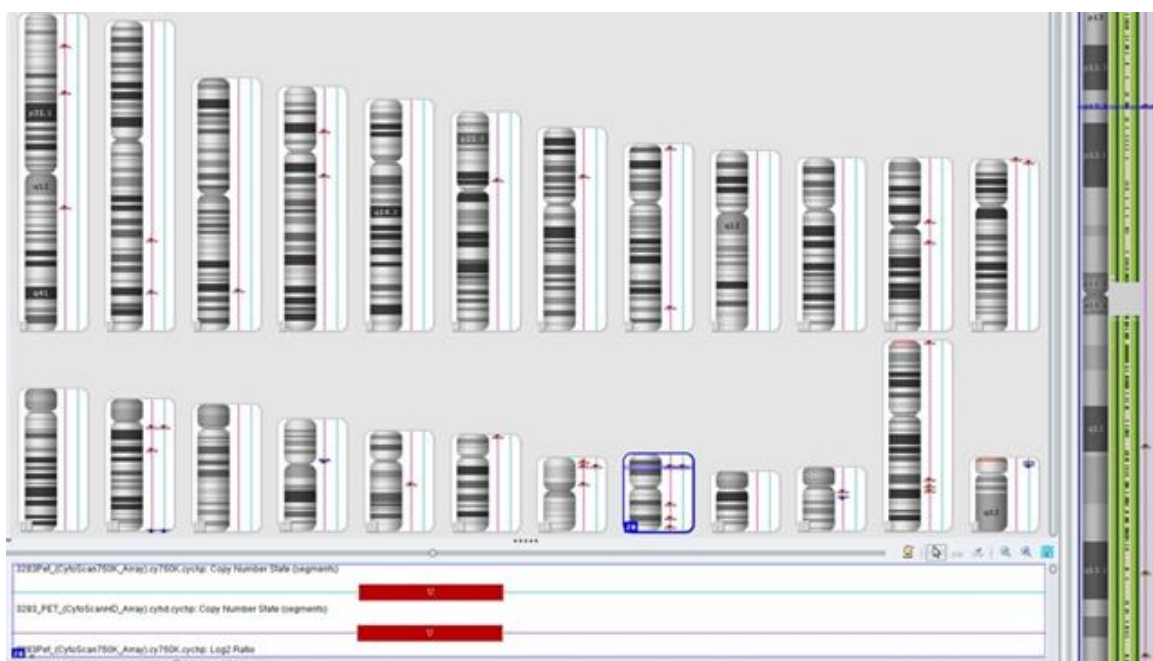


Рисунок 8 – Делеция участка 20 хромосомы 20q12.2 у пациента с синдромом Алажилля

Исходя из полученных нами результатов и оценки возможностей применения молекулярно-генетических методов показано, что оптимальным методом выбора является секвенирование полного экзома с учетом данных анамнеза, клинического осмотра, лабораторного и инструментального обследования. Отсутствие результатов при проведении WES не всегда является конечной точкой обследования. Так, при подозрении на синдром Алажилля, у пациента может быть проведен ХМА с целью выявления делеции 20p12.2. Указание локации предполагаемой перестройки также позволяет оптимизировать время анализа биоинформатических данных: вместо анализа перестроек по всем 23 хромосомам, в первую очередь возможна оценка состояния указанного региона.

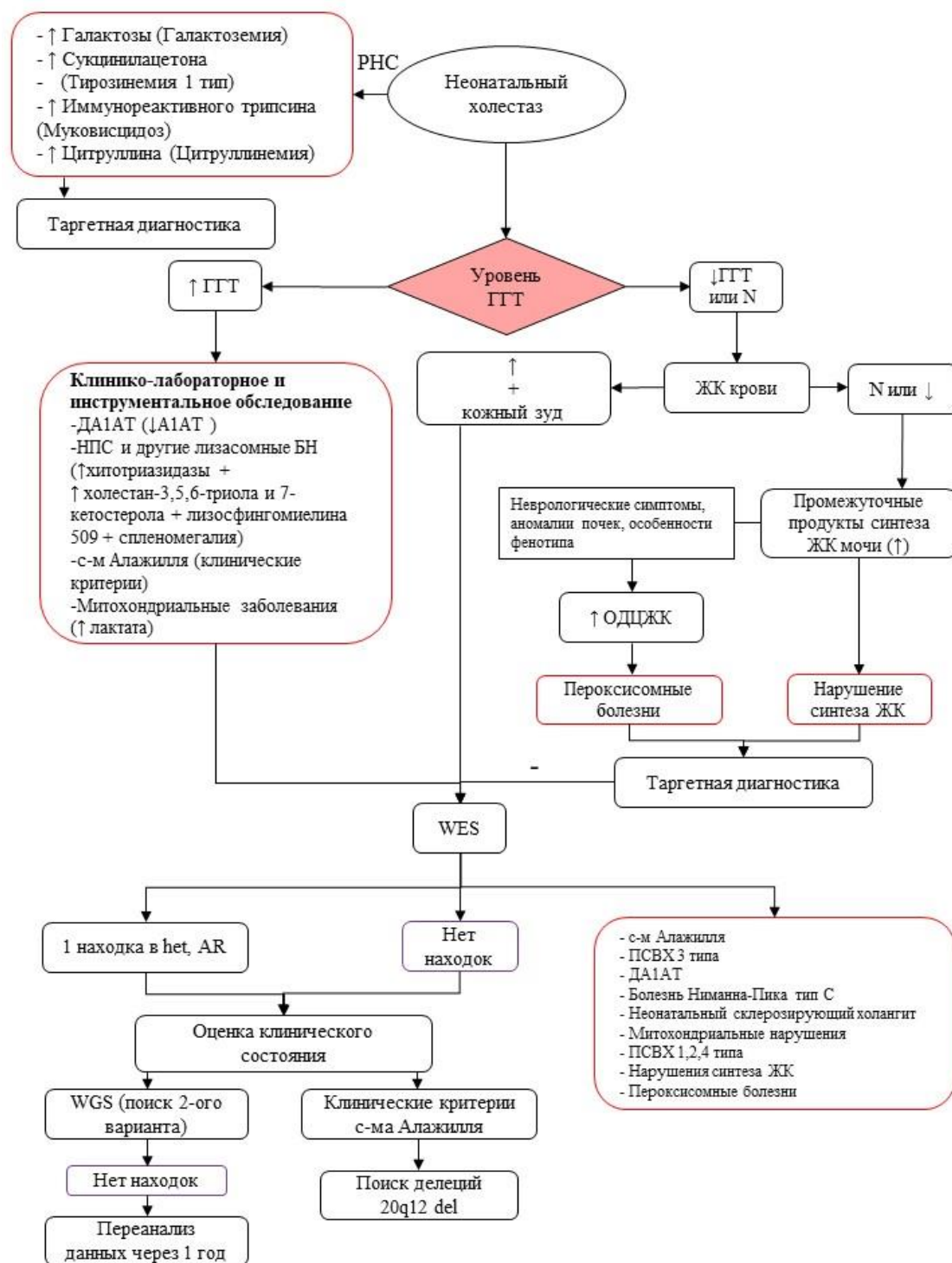
**Оптимизация алгоритма диагностики.** Ключевой задачей данной работы являлась оптимизация алгоритма диагностики моногенных заболеваний, сопровождающихся холестаазом. Важным аспектом работы стала подготовка клинического алгоритма обследования (Таблица 9) с критериями, характерными для группы наследственных

заболеваний с неонатальным холестазом. При многих заболеваниях из этой группы поражение печени сочетается с другими особенностями развития, в связи с чем задачей данного списка клинических симптомов стала стандартизация оценки пациентов по органам и системам. Это не только позволит врачам провести пациенту соответствующее комплексное обследование, но и оптимизирует клиническую информацию о состоянии пациента для биоинформатического анализа и сузит спектр анализируемых генов. Такой подход к улучшению взаимодействия между врачами и биоинформатиками существенно сокращает диагностический поиск и сроки постановки диагноза.

Таблица 9 – Список клинических симптомов, характерных для моногенных заболеваний с неонатальным холестазом

<b>ЖКТ</b>	Нет отклонений		Аномальная форма тел позвонков
	Порок развития (уточнить):		Позвонки-бабочки
	Холестаза		Дефект сегментации позвонков
	Гепатомегалия		другое
	Спленомегалия	<b>Глаза</b>	Нет отклонений
	Портальная гипертензия		Задний эмбриотоксон
	Желтуха		Дистрофия роговицы
	Зуд		Аномалии зрачка
	Ахолия/гипохолия стула		Другое
	Другое		
<b>Развитие</b>	Нет отклонений	<b>Почки</b>	Нет отклонений
	ЗВУР		Дисплазия
	Дефицит роста		Поликистоз
	Дефицит веса		Стеноз почечной артерии
	Низкая масса тела при рождении		Уменьшение количества пирамидок
<b>Сердце</b>	Нет отклонений		Другое
	Врожденный порок (уточнить):	<b>Другие</b>	
	Другое		
<b>Скелет</b>	Нет отклонений		

Учитывая данные мировой литературы, сравнительный анализ ключевых клинико-лабораторных и инструментальных показателей, а также результаты оценки эффективности проведенных молекулярно-генетических методов, нами был сформулирован оптимизированный алгоритм диагностического поиска у детей с подозрением на генетическую этиологию синдрома холестаза (Рисунок 9).



*Примечание* – N – норма, ГТТ – гамма-глутаминтрансфераза, ЩФ – щелочная фосфатаза, WES – whole exome sequencing (полноэкзомное секвенирование), WGS – whole genome sequencing (полногеномное секвенирование), НПС – болезнь Ниманна-Пика тип С, БН – болезни накопления, РНС – расширенный неонатальный скрининг, А1АТ – альфа-1-антитрипсин, ЖК – желчные кислоты, ОДЦЖК – очень длинноцепочечные жирные кислоты, het – гетерозигота, AR – аутосомно-рецессивный тип наследования);

Рисунок 9 – Оптимизированный алгоритм дифференциальной диагностики моногенных заболеваний, проявляющихся неонатальным холестазом

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании были охарактеризованы ключевые параметры для наиболее частых моногенных заболеваний с НХ в первые 3 месяца жизни: синдром Алажилля, ПСВХ 1-го и 2-го типов, дефицит альфа-1-антитрипсина, а также описаны клинические наблюдения пациентов с крайне редкими наследственными заболеваниями с НХ. Проанализированы первые симптомы, которые были неспецифичными и представлены желтухой, синдромом холестаза, цитолиза и геморрагическим синдромом. В нашем исследовании наиболее часто выявлялась желтуха, однако, она не всегда являлась поводом для проведения расширенного биохимического анализа крови и других исследований, что приводило к несвоевременной диагностике. Так же показано, что у детей с неонатальным холестазом в первые 3 месяца жизни в 13-31% случаев могут быть выявлены клинико-лабораторные и инструментальные признаки билиарной атрезии. Кроме того, при синдроме Алажилля у 21,4% детей выявлено менее 3 классических клинических критериев, что затрудняло дифференциальную диагностику с билиарной атрезией в первые 3 месяца жизни. Специфические лабораторные маркеры выявлены только при 21,4% редких моногенных форм холестаза.

Для определения эффективности различных молекулярно-генетических исследований нами проводилось обследование детей с синдромом холестаза в первые 3 месяца жизни с использованием разных комбинаций методов. Решение данной задачи позволило продемонстрировать необходимость применения полноэкзомного секвенирования детям с недифференцированным синдромом холестаза в качестве метода выбора первой линии. Обширные биохимические и гистологические исследования в области диагностики неонатального холестаза за последние 20 лет показали низкую дифференциально - диагностическую эффективность. В этой связи генетические исследования этиологии неонатального холестаза сильно продвинулись вперед. Алгоритм, разработанный в настоящем исследовании, учитывает не только фенотип, но и клинико-лабораторные, инструментальные данные.

Проведение последовательного секвенирования панели генов и экзома нецелесообразно как с финансовой точки зрения, так и с позиции сроков постановки диагноза, так как полноэкзомное секвенирование перекрывает не только большее количество генов, но и дает возможность оценить возможное наличие CNV. Показано, что секвенирование экзома является мощным инструментом у пациентов с подозрением на моногенные заболевания и может эффективно использоваться при диагностике моногенных заболеваний с неонатальным холестазом. Кроме того, в нашем исследовании в рамках секвенирования полного экзома были выявлены варианты в 11 генах, не входящих в состав генетической панели.

При проведении оценки эффективности применения того или иного молекулярно-

генетического метода в настоящем исследовании показано, что оптимальным методом выбора первой линии является секвенирование полного экзона с учетом данных анамнеза, клинического осмотра, лабораторного и инструментального обследования. В данной работе использование алгоритма обследования позволило сузить спектр предполагаемых причин НХ и, соответственно, генов. В отсутствие результатов при проведении WES при наличии соответствия клиническим критериям при подозрении на СА (высокая активность ГГТ, ахоличный стул, особенности фенотипа, ВПС), у пациента может быть проведен поиск делеции в области 20p12.2 с использованием референсных методов.

Генетически обусловленные заболевания с неонатальным холестазом остаются актуальной сферой для молекулярно-генетических исследований. На сегодняшний день проблема их ранней дифференциальной диагностики является крайне актуальной. На фоне активного внедрения методов секвенирования в клиническую практику выросла доля ген-ассоциаций, связанных с НХ: новые гены, ассоциированные с группой ПСВХ были описаны в последние 3 года. В этой связи следующим этапом модернизации подхода к диагностике становится именно повышение скорости проводимого секвенирования полного экзона или генома и биоинформатического анализа данных.

## ВЫВОДЫ

1. При синдроме Алажилля у 21,4% детей выявлено менее 3 классических клинических критериев и только у 10% детей все критерии, что затрудняло дифференциальную диагностику с билиарной атрезией в первые 3 месяца жизни. У 13% пациентов с СА отмечались клинические и ультразвуковые признаки билиарной атрезии.

2. Установлено, что в первые 3 месяца жизни холестаз при прогрессирующем семейном внутрипеченочном холестаза 1-го и 2-го типов сопровождался кожным зудом у 67% детей наряду с нормальным сывороточным уровнем ГГТ, холестерина и повышением уровня желчных кислот.

3. У всех детей с подозрением на билиарную атрезию необходимо исключать дефицит альфа-1-антитрипсина. Симптомокомплекс БА выявлен у 13% детей с дефицитом альфа-1-антитрипсина.

4. Специфические лабораторные маркеры выявлены только при 21,4% других редких моногенных форм холестаза: болезни Ниманна-Пика тип С, синдром Цельвегера, врожденное нарушение синтеза желчных кислот. У 31,2% пациентов данной группы, имеющих синдром холестаза с повышением ГГТ, отмечался клиничко-лабораторный симптомокомплекс билиарной атрезии.

5. Установлено, что наличие ЗВУР более характерно для детей с синдромом Алажилля, чем для прогрессирующего семейного внутрипеченочного холестаза 1-го и 2-го типов и дефицита альфа-1-антитрипсина; кожный зуд в первые 3 месяца жизни более характерен для детей с прогрессирующим семейным внутрипеченочным холестазом 1 и 2 типов; при синдроме Алажилля чаще отмечались аномалии строения и формы желчного пузыря и пороки и аномалии со стороны других органов, в отличие от прогрессирующего семейного внутрипеченочного холестаза 1 и 2 типов и дефицита альфа-1-антитрипсина.

6. Доля выявленных моногенных заболеваний с неонатальным холестазом при секвенировании полного экзона была значимо выше, чем при секвенировании панели генов (25% против 9%).

7. Выявлено, что у 2% пациентов с клиническими критериями синдрома Алажилля отсутствовали патогенные и вероятно-патогенные варианты при полноэкзомном секвенировании. Диагноз был установлен при проведении хромосомного микроматричного анализа, выявившего делецию 20p12.2.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. У детей первых 3 месяцев жизни с клиническими и ультразвуковыми признаками билиарной атрезии необходимо проводить обследование, направленное на исключение моногенных заболеваний.

2. В первые 3 месяца жизни отсутствие кожного зуда и характерных аномалий и пороков развития других органов не исключает синдром Алажилля. С целью подтверждения диагноза показано проведение молекулярно-генетического исследования.

3. Всем детям с синдромом холестаза показано исследование уровня ГГТ и холестерина, низкий уровень которых характерен для прогрессирующего семейного внутрипеченочного холестаза 1-го и 2-го типов, а также уровня желчных кислот крови, нормальный или сниженный уровень которых характерен для врожденного нарушения синтеза желчных кислот и пероксисомных заболеваний.

4. Исследование специфических лабораторных маркеров позволяет заподозрить дефицит А1АТ, болезнь Ниманна – Пика тип С, пероксисомные заболевания, врожденные нарушения синтеза желчных кислот.

5. Детям с недифференцированным синдромом холестаза необходимо проводить комплексное обследование органов и систем в соответствии с предложенным чек-листом, включающее ультразвуковое исследование органов брюшной полости строго натощак, почек, сердца, исследования слуха, осмотры узких специалистов (офтальмолог, невролог, эндокринолог и др.).

6. У детей с неонатальным холестазом в качестве метода выбора первой линии при молекулярно-генетическом обследовании необходимо проводить полноэкзомное секвенирование.

7. При наличии клинико-лабораторных и инструментальных показателей, характерных для синдрома Алажилля наряду с отсутствием вероятно-патогенных и патогенных вариантов при полноэкзомном секвенировании, необходимо проводить хромосомный микроматричный анализ.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Докшуккина, А. А.** Основные принципы нутритивной поддержки детей раннего возраста с синдромом холестаза / А. В. Дегтярева, А.А. Докшуккина, М. Б. Албегова // Неонатология: Новости. Мнения. Обучение. – 2022. – Т. 10, № 2 (36). – С. 29–37.

2. **Докшуккина, А. А.** Ультразвуковая картина гепатобилиарной системы, почек и сердца у ребенка с синдромом Алажилля (клиническое наблюдение) / Е. А. Филиппова, А. Б. Сугак, А. В. Дегтярева, А. А. Докшуккина, М. И. Пыков, М. Б. Албегова, А. А. Пучкова // Ультразвуковая и функциональная диагностика. – 2021. – Т. 2. – С. 10.

3. **Докшуккина, А. А.** Мараликсibat-альтернатива трансплантации печени у детей с синдромом Алажилля / А. В. Дегтярев, Е. И. Савельева, Е. А., Филиппова, А. А. Докшуккина, М. Х. Исаева, В. В. Зубков, М. Б. Албегова // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2022. – Т. 67, № 6. – С. 123–130.

4. **Докшуккина, А. А.** Ранние клинико-лабораторные и инструментальные характеристики синдрома Алажилля / А. В. Дегтярева, А. А. Докшуккина, М. С. Готье, Е. А. Филиппова, Е. Л. Туманова, Е. Ю., Захарова, М. Б. Албегова, С. И. Жданова, А. А. Пучкова, М. Х. Исаева, Е. Шубина, Е. А. Гусарова // Неонатология: Новости. Мнения. Обучение. – 2024. – Т. 12, № 1. – С. 27–36.

5. **Dokshukina A.** Newly described mutations of the *UNC45A* gene in infant with jaundice and pruritus/ A. Degtyareva, A. Dokshukina, E. Filippova, Je. Shubina, E. Tolmacheva, I.Sadelov, M. Albegova, D. Degtyarev // Current Pediatric Reviews. – 2024. – V. 20. – P. 1-8.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АЛТ – аланинтрансаминаза	СА – синдром Алажилля
АСТ – аспарат	СЦ – синдром Цельвегера
АФП – альфа-фетопротеин	ТГ – триглицериды
БА – билиарная атрезия	ТП – трансплантация печени
ВПС – врожденный порок сердца	УЗИ – ультразвуковое исследование
ГГТ – гамма-глутаминтрансфераза	ХМА – хромосомный микроматричный анализ
ГЦК – гепатоцеллюлярная карцинома	ХПН – хроническая почечная недостаточность
ДА1АТ – дефицит альфа-1-антитрипсина	ХЭ – холинэстераза
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота	ЩФ – щелочная фосфатаза
ЖК – желчные кислоты	ЭПР – эндоплазматический ретикулум
ЖП – желчный пузырь	AD – аутосомно-доминантный тип наследования
ЗВУР – задержка внутриутробного развития	AR – аутосомно-рецессивный тип наследования
ЗССЦ – заболевания спектра синдрома Цельвегера	FDA – drug association
ЛА – легочная артерия	MLPA – мультиплексная амплификация проб с помощью лигирования
МНО – Международное нормализованное отношение	NGS – new-generation sequencing (секвенирование нового поколения)
МРТ – магнитно-резонансная томография	TGS – target genomic sequencing
НПС – болезнь Ниманна – Пика тип С	VUS – variant with unknown significant (вариант неопределенной клинической значимости)
НХ – неонатальных холестаза	WES – whole exome sequencing (полноэкзомное секвенирование)
ОДЦЖК – очень длинноцепочечные жирные кислоты	WGS – whole genome sequencing (полногеномное секвенирование)
ПЖ – поджелудочная железа	
ПСВХ – прогрессирующий семейный внутрипеченочный холестаза	
ПТИ – протромбиновый индекс	
ПЦР – полимеразная цепная реакция	