КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И НАБЛЮДЕНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА БОЛЕЗНИ ВИЛЬСОНА-КОНОВАЛОВА

Гернер Е.А.[1], Назаров В.Д.[1], Федорова Т.Ф.[2], Лапин С.В.[1], Павлова Т.А.[3], Новиков С.А.[1], Алексеева Т.М.[3], Эмануэль В.Л.[1], Панина Е.Б.[3]

[1]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, улица Льва Толстого 6-8, 197022, Санкт-Петербург, Россия
[2]Федеральное государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Санкт-Петербургская клиническая больница российской академии наук», проспект Тореза, 72, 194017, Санкт-Петербург, Россия
[3]Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, проспект Пархоменко, 15, 194156, Санкт-Петербург, Россия

Введение. *Клиническая картина болезни Вильсона-Коновалова (БВК) характеризуется выраженным полиморфизмом, а классические лабораторные исследования часто не позволяют поставить диагноз. Наиболее достоверным способом подтверждения БВК является определение мутаций в гене ATP7B.*
Материалы и методы. *В ходе исследования был разработан метод генетической диагностики, включающий в себя проведение ПЦР в реальном времени для определения точечной мутации в сочетании с фрагментным анализом для выявления делеций и инсерций. В исследовании приняли участие пациенты с диагнозом БВК, который был поставлен на основании клинико-лабораторных критериев заболевания согласно бальной Лейпцигской шкале (1-я группа, n=20). Для разработки методики выявления мутаций в гене ATP7B, наиболее распространенных в российской популяции, была собрана группа пациентов с уже известными мутациями (2-я группа, n=3). У всех пациентов было проведено генотипирование с помощью разработанной методики. Для 12 пациентов были собраны анамнестические, клинические и лабораторные данные.*
Результаты. *У пациентов из 1-й группы были выявлены следующие аберрации: гетерозиготные мутации по H1069Q (60%), гомозиготные мутации по H1069Q (30%), сочетание мутаций 3627_3630del.4/ H1069Q в гетерозиготной форме (5%), сочетание мутаций 1770insT/H1069Q в гетерозиготной форме (5%).*
Обсуждение. *Клинический симптомокомплекс БВК не является строго очерченным, а типичное для БВК сочетание поражения печени и нервной системы, колец Кайзера-Флейшера присутствует далеко не у всех больных или появляется уже на поздних стадиях заболевания. Наличие значительного количества ложноотрицательных результатов лабораторных маркеров БВК говорит о недостаточной чувствительности данных методов исследования. Вариабельность клинических и лабораторных маркеров БВК задерживает постановку этиологического диагноза и начало патогенетической терапии.*
Вывод. *Разработанный метод генетической диагностики БВК рекомендуется проводить у всех пациентов российской популяции с подозрением на печеночную, неврологическую или смешанную форму БВК с целью своевременной постановки диагноза и начала лечения.*

Ключевые слова: болезнь Вильсона-Коновалова, своевременная диагностика, мутации в гене ATP7B

Для цитирования: Гернер Е.А., Назаров В.Д., Федорова Т.Ф., Лапин С.В., Павлова Т.А., Новиков С.А., Алексеева Т.М., Эмануэль В.Л., Панина Е.Б. Клинико-лабораторная и молекулярно-генетическая диагностика болезни Вильсона-Коновалова. *Российский неврологический журнал.* 2019;24(3):10–18 (Russian). DOI 10.30629/2658-7947-2019-24-3-10-18.
Для корреспонденции: Гернер Екатерина Александровна – студентка VI курса ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова Минздрава России, ул. Льва Толстого, 6-8, Санкт-Петербург, 197022; e-mail: gerneryekaterina@mail.ru; https://orcid.org/0000-0001-8083-2023

CLINICAL LABORATORY AND MOLECULAR GENETIC DIAGNOSIS OF WILSON-KONOVALOV DISEASE

Gerner E.A.[1], Nazarov V.D.[1], Fedorova T.F.[2], Lapin S.V.[1], Pavlova T.A.[3], Novikov S.A.[1], Alekseeva T.M.[3], Emanuel V.L.[1], Panina E.B.[3]

[1]Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Academician I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University» of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, 6-8, L'va Tolstogo street, Saint-Petersburg, 197022, Russia
[2]Federal State Budgetary Healthcare Institution «St. Petersburg clinical hospital of the Russian Academy of Sciences», 72, Morisa Toreza Avenue, Saint-Petersburg, 194017, Russia
[3]Federal State Budgetary Institution «Almazov National Medical Research Centre» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 15, Parkhomenko street, Saint-Petersburg, 194156, Russia

Introduction. *The clinical picture of Wilson-Konovalov disease (WKD) is characterized by pronounced polymorphism and classical laboratory findings often do not allow to make diagnosis. The most reliable way to confirm the presence of WKD is to identify mutations in the ATP7B gene.*
Materials and methods. *In the course of the research, we developed a method of genetic diagnostics, including real-time PCR to determine a point mutation in combination with fragment analysis to identify deletions and insertions. 20 patients were collected in whom the diagnosis of WKD was made basing on the results of clinical and laboratory*

criteria of the disease according to the Leipzig scoring system. All patients were genotyped with the developed technique. Anamnestic, clinical, and laboratory data were collected for 12 patients.
Results. *We detected the following aberrancies in patients from the group 1: heterozygous mutations according to H1069Q (60%), homozygous mutations according to H1069Q (30%), combination of mutations 3627_3630del.4/H1069Q in heterozygous form (5%), combination of mutations1770insT/H1069Q in heterozygous form (5%).*
Discussion. *Clinical feature of WKD is non-specific, and the combination of liver and nervous system damage typical for WKD, Kayser–Fleischer rings are far from being present in all patients or appear in the later stages of the disease. A considerable amount of false-negative results of WKD laboratory markers indicates the insufficient sensitivity of these research methods. The variability of clinical and laboratory markers of WKD delays the etiology diagnosis and the onset of pathogenetic therapy.*
Conclusion. *The developed method of genetic diagnosis of WKD is recommended for all patients of the Russian population with suspected hepatic, neurological or mixed form of WKD in order to make a timely diagnosis and start treatment.*

Key words: *Wilson-Konovalov disease, timely diagnosis, mutations in the ATP7B gene.*

For citation: Gerner E.A., Nazarov V.D., Fedorova T.F., Lapin S.V., Pavlova T.A., Novikov S.A., Alekseeva T.M., Emanuel V.L., Panina E.B. Clinical laboratory and molecular genetic diagnosis of Wilson-Konovalov disease. *Russian Neurological Journal (Rossijskij Nevrologicheskiy Zhurnal)* 2019;24(3):10–18 (Russian). DOI 10.30629/2658-7947-2019-24-3-10-18.
For correspondence: Gerner E.A. – student of 6th year Pavlov First State Medical University, Saint-Petersburg, 6-8, L'va Tolstogo street, Russia; e-mail: gerneryekaterina@mail.ru; https://orcid.org/0000-0001-8083-2023
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.
Acknowledgments. The grant of the Russian Science Foundation (№16-15-10203).
Information about authors:
Gerner E.A. – https://orcid.org/0000-0001-8083-2023
Nazarov V.D. – https://orcid.org/0000-0002-9354-8790,
Fedorova T.F. – https://orcid.org/0000-0002-1014-6404,
Lapin S.V. – https://orcid.org/0000-0002-4998-3699,
Pavlova T.A. – https://orcid.org/0000-0003-1589-4871,
Novikov S.A. – https://orcid.org/0000-0002-6353-3723,
Alekseeva T.M. – https://orcid.org/0000-0001-6901-3246,
Emanuel V.L. – https://orcid.org/0000-0002-2079-0439,
Panina E.B. – https://orcid.org/0000-0001-6951-4198

Received 12.05.19
Accepted 25.05.19

Введение

Болезнь Вильсона-Коновалова (БВК) представляет собой тяжелое неврологическое наследственное аутосомно-рецессивное заболевание, клинические проявления которого связаны с накоплением избыточных концентраций меди в печени, головном мозге, роговице глаза, почках и других органах [1, 2]. Распространенность БВК составляет 1-9 случаев на 100 тыс. населения [3].

В основе патогенеза БВК лежат мутации гена *ATP7B*, расположенного на длинном плече 13-й хромосомы. Ген кодирует трансмембранный белок, необходимый для поддержания нормального метаболизма меди, а также для встраивания меди в плазменный белок-переносчик церулоплазмин. При нарушении функции белка ATP7B медь в избыточном количестве откладывается в органах и в тканях [4, 5].

Наиболее частой мутацией у пациентов с БВК в европейской и российской популяциях является точечная мутация H1069Q (C3207 C>A) в экзоне 14. В российской популяции также распространены мутации, характеризующиеся потерей или приобретением нескольких нуклеотидов: делеции – 1340_1343 del.4,2532del.A, 3026_3028 del.TCA, 3402 del.C, 3947 del.C, 3942 del.AT, 3627_3630del.4, 3649_3654del.6, и инсерции – 1770ins.T, 2304insC, 3029insT, 3031insC [3, 6–9].

БВК относится к числу трудно диагностируемых заболеваний. Это связано как с длительным латентным течением, полиморфизмом клинических проявлений, так и с недостаточной информативностью результатов биохимических исследований, которые отражают сдвиги метаболизма при БВК [10–12].

Наиболее часто БВК манифестирует с симптомов поражения печени, при этом каких-либо специфических клинических симптомов для «Вильсоновского» гепатита или цирроза не существует [10, 13]. Неврологические нарушения могут присоединиться впоследствии, оказываются неспецифичными и часто симулируют другие заболевания ЦНС, проявляющиеся поражением экстрапирамидной системы. В более редких случаях БВК манифестирует с неврологических симптомов, наиболее распространёнными из которых являются дизартрия смешанного генеза, постуральный тремор, паркинсонизм, различные формы дистонии, мозжечковая атаксия. В связи с развитием заболевания в молодом возрасте и схожими неврологическими симптомами БВК необходимо дифференцировать с атипичной ювенильной формой болезни Паркинсона, торсионной дистонией, дрожательной формой рассеянного склероза, последствиями энцефалитов, наследственными мозжечковыми атаксиями. В некоторых наблюдениях на первый план могут выходить психические нарушения, такие как депрессия, острый психоз, шизоидное расстройство личности, а также снижение когнитивных функций [2, 14].

Роговичные кольца Кайзера-Флейшера наиболее часто выявляются при неврологической стадии заболевания, а при изолированных печеночных проявлениях отсутствуют в половине случаев. По мнению большинства исследователей, диагностическая чувствительность и специфичность таких лабораторных

показателей как уровень церулоплазмина, суточная экскреция меди с мочой, а также концентрация общей и свободной меди сыворотки остаются недостаточными для подтверждения диагноза БВК [10, 15–17].

В связи со сложностью диагностики общепринятым в мире является диагноз БВК, установленный по совокупности клинических, лабораторных и молекулярно-генетических маркеров заболевания (Лейпцигская количественная шкала, 2001 г.), при этом абсолютным подтверждением диагноза является обнаружение в гене *ATP7B* мутаций на обеих хромосомах [6].

Для российской популяции известен спектр наиболее распространенных мутаций при БВК, поэтому полный анализ последовательностей 40 экзонов в гене *ATP7B* на первом этапе не требуется [3]. Однако частое присутствие инсерций и делеций требует проведения комплексного молекулярно-биологического исследования для определения характера генетической аберрации и подтверждения диагноза.

Целью работы был анализ клинических, лабораторных и молекулярно-генетических данных пациентов с БВК.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие пациенты с диагнозом БВК, который был поставлен на основании клинико-лабораторных критериев заболевания согласно бальной Лейпцигской шкале (1-я группа, *n*=20). Для разработки методики выявления мутаций в гене *ATP7B*, наиболее распространенных в российской популяции, была собрана группа пациентов с уже известными мутациями (2-я группа, *n*=3). У всех пациентов было собрано добровольное информированное согласие на проведение генетического исследования. У всех пациентов, включенных в исследование, геномная ДНК была выделена из лейкоцитов периферической крови с помощью стандартного протокола [18].

Определение распространенной точечной мутации H1069Q проводилось с помощью метода ПЦР в реальном времени. Для исследования небольших инсерций и делеций (1340_1343 del.4, 2532del.A, 3026_3028 del.TCA, 3402 del.C, 3947 del.C, 3942 del.AT, 3627_3630del.4, 3649_3654del.6, 1770ins.T, 2304insC, 3029insT, 3031insC) в гене *ATP7B* была разработана мультитаргетная методика, основанная на методе фрагментного анализа. Последовательности используемых праймеров и протоколы проведения реакций могут быть высланы по запросу.

Первично разработанная методика была апробирована на пациентах из группы 2 с известными мутациями в гене *ATP7B*. После этого все пациенты из группы 1 были протипированы на наличие мутаций в гене *ATP7B* с использованием разработанной методики. Для 12 пациентов были собраны анамнестические, клинические и лабораторные данные.

Результаты

В ходе проведения апробации теста были определены положительные и отрицательные результаты на исследуемые мутации в гене *ATP7B*. На рис. 1 (см. 3-ю полосу обложки) изображены положительные результаты на мутацию H1069Q в гомозиготном состоянии и на мутацию 3627_3630del.4 в гетерозиготном состоянии.

У всех пациентов из 1-й группы ген *ATP7B* был протипирован с использованием разработанной методики. Спектр мутаций, выявленных в данной группе, представлен в табл. 1.

Таблица 1

Спектр мутаций в гене *ATP7B* у пациентов из 1-й группы

Выявленные мутации	Число пациентов
Гомозиготы по H1069Q	6
Гетерозиготы по H1069Q	12
Компаунд-гетерозигота: 3627_3630del.4/H1069Q	1
Компаунд-гетерозигота: 1770ins.T/H1069Q	1

Table 1

Spectrum of mutations in the gene *ATP7B* in patients from group 1

Identified mutations	Number of patients
H1069Q homozygotes	6
H1069Q heterozygotes	12
Compound heterozygote: 3627_3630del.4/H1069Q	1
Compound heterozygote: 1770ins.T/H1069Q	1

Анамнестические, клинические и лабораторные данные были собраны для 12 пациентов из 1-й группы. Информация представлена в табл. 2 и 3. На момент проведения исследования все пациенты получали патогенетическую терапию. Такие лабораторные показатели как концентрация церулоплазмина в сыворотке крови, суточная экскреция меди с мочой, концентрация общей и свободной меди в сыворотке крови представлены на момент постановки диагноза до инициации патогенетической терапии.

Обсуждение

Болезнь Вильсона-Коновалова является актуальной проблемой современной неврологии. Клиническая картина БВК характеризуется выраженным полиморфизмом и отсутствием строго патогномоничных симптомов, а классические лабораторные исследования часто не позволяют достоверно подтвердить диагноз. Это приводит к несвоевременной постановке этиологического диагноза, что снижает эффективность патогенетической терапии и ухудшает прогноз заболевания. Наиболее достоверным способом подтверждения диагноза БВК является определение мутаций в гене *ATP7B*. С точки зрения генетики БВК ассоциирована с большим спектром различных аберраций, однако существует географическое распределение их форм. В связи с этим разработанная генетическая панель, направленная на выявление распространенных в российской популяции мутаций, является наиболее оправданным методом лабораторного подтверждения БВК.

Таблица 2

Клинико-анамнестические данные пациентов с БВК на момент постановки диагноза

№	ВД	ВПД	Неврологические проявления						ККФ	МРТ	ПП
			ЭН			МН	РН	ППС			
			Б+Р	Т	Д						
1	24	24	-	-	++	+	++	+	+	+	Ц В (4)
2	24	27	++	+	+	+	++	++	+	+	Ц А (3)
3	47	47	+	+++	-	++	++	-	+	+	Ц А (3)
4	20	20	+	+	+	+	+	+	-	-	Г (1)
5	30	34	-	+	-	+	-	+	+	+	Ц А (3)
6	14	14	-	-	-	-	-	-	+	-	ФПН
7	6	6	-	-	-	-	-	-	-	-	Г (1)
8	9	21	-	+	-	+	-	-	+	-	Ц В (4)
9	27	28	+	+	-	+	-	-	+	+	Г (3)
10	19	20	-	+	-	+	-	-	+	-	Ц В (4)
11	19	24	-	+	-	++	++	+	+	-	Ц А(3)
12	10	31	+	+	-	++	++	+	+	+	Ц В (4)

Примечание: ВД – возраст дебюта БВК; ВПД – возраст постановки диагноза БВК; ЭН – экстрапирамидные нарушения; Б+Р – брадикинезия и ригидность; Т – тремор; Д – дистония; МН – мозжечковые нарушения; РН – речевые нарушения (диазартрия, дисфония); ППС – патология психической сферы; ККФ – кольцо Кайзера-Флейшера: + – выявлено ККФ; - – не ККФ или не производилось исследование глазного яблока в щелевой лампе; МРТ – магнитно-резонансная томография головного мозга: + – выявлены характерные для БВК изменения на МРТ головного мозга (хотя бы одно явление из перечисленных: гиперинтенсивность сигнала в Т2-режиме в области базальных ядер, ствола мозга, мозжечка, белого вещества), - – не выявлены характерные для БВК изменения на МРТ головного мозга; ПП – тяжесть поражения печени: Ц – цирроз по Child-Pugh (степень фиброза по METAVIR), Г – гепатит (степень фиброза по METAVIR), ФПН – фульминантная печеночная недостаточность.

Table 2

Clinical findings and anamnestic data of patients with WKD at the time of diagnosis

№	AO	AD	Neurological manifestations						KFr	MRI	LDS
			EPS			CD	SD	MP			
			B+R	T	D						
1	24	24	-	-	++	+	++	+	+	+	C B (4)
2	24	27	++	+	+	+	++	++	+	+	C A (3)
3	47	47	+	+++	-	++	++	-	+	+	C A (3)
4	20	20	+	+	+	+	+	+	-	-	H (1)
5	30	34	-	+	-	+	-	+	+	+	C A (3)
6	14	14	-	-	-	-	-	-	+	-	FHF
7	6	6	-	-	-	-	-	-	-	-	H (1)
8	9	21	-	+	-	+	-	-	+	-	C B (4)
9	27	28	+	+	-	+	-	-	+	+	H (3)
10	19	20	-	+	-	+	-	-	+	-	C B (4)
11	19	24	-	+	-	++	++	+	+	-	C A (3)
12	10	31	+	+	-	++	++	+	+	+	C B (4)

Note: AO – age of WKD onset; AD – age of diagnosis; EPS – extrapyramidal side effects; B+R – bradykinesia and rigidity; T – tremor; D – dystonia; CD – cerebellar disorders; SD –speech disorders (dysarthria, dysphonia); MP – pathology of the mental sphere; KFr – Kayser-Fleischer ring: + – revealed Kayser-Fleischer ring; - – non-revealed Kayser-Fleischer ring or the eyeball was not studied in the slit lamp; MRI – magnetic resonance imaging of the brain: + – on MRI of the brain characteristic for WKD changes were revealed (at least one of the following phenomena: the hyperintensity of the signal in the T2 mode in the region of the basal nuclei, brain stem, cerebellum, white matter), - – on MRI of the brain characteristic for WKD changes were not revealed; LDS – severity of liver damage: C – Child-Pugh cirrhosis (degree of fibrosis corresponding to METAVIR); H – hepatitis (degree of fibrosis corresponding to METAVIR); FHF – fulminant hepatic failure.

Таблица 3

Лабораторная и молекулярно-генетическая характеристика пациентов с БВК на момент постановки диагноза

№	Ц, мг/л (N 200-600)	ОМ, мкмоль/л (N 11-24)	МНЦП, % от ОМ (N< 10%)	ММ, мкмоль/сут (N<1,6)	М
1	-	-	-	-	H1069Q/H106Q
2	53	5,00	↑ (50)	12,4	1770insT/H106Q
3	125	7,5	N (22)	5,4	H1069Q/-
4	119	10,8	↑ (48)	1,2	H1069Q/H106Q
5	102	10,8	↑ (56)	3,7	H1069Q/-
6	20	9,6	↑ (90)	10,3	H1069Q/-
7	208	-	-	-	H1069Q/-
8	84	8,6	↑ (54)	4,7	3627_3630del.4/ H1069Q
9	54	4,7	↑ (46)	7,7	H1069Q/-
10	123	10,0	↑ (42)	3,5	H1069Q/H106Q
11	80	6,9	↑ (46)	4,8	H1069Q/H106Q
12	74	4,72	N (26)	3,5	H1069Q/-

Примечание: Ц – концентрация церулоплазмина в сыворотке крови в мг/л; ОМ – содержание общей меди в крови в мкмоль/л; МНЦП (расчетный показатель) – медь, не связанная с церулоплазмином: ↑ – выше нормы (>2,0 мкмоль/л) и в % от содержания общей меди; ММ – экскреция меди за 24 ч в мкмоль/сут; М – выявленные мутации в гене ATP7B: H1069Q/H106 – гомозигота по H1069Q, H1069Q/- – гетерозигота по H1069Q, 1770insT/H106Q – сочетание мутации H1069Q и инсерции 1770insT в гетерозиготных состояниях, 3627_3630del.4/H1069Q – сочетание мутации H1069Q и делеции 3627_3630del.4 в гетерозиготных состояниях.

Table 3

Laboratory and molecular genetic features of patients with WKD at the time of diagnosis

№	CP, mg/l (N 200-600)	TC, µmol/l (N 11-24)	CNRC, % of TC (N< 10%)	CE in µmol/day (N<1,6)	M
1	-	-	-	-	H1069Q/H106Q
2	53	5,00	↑ (50)	12,4	1770insT/H106Q
3	125	7,5	N (22)	5,4	H1069Q/-
4	119	10,8	↑ (48)	1,2	H1069Q/H106Q
5	102	10,8	↑ (56)	3,7	H1069Q/-
6	20	9,6	↑ (90)	10,3	H1069Q/-
7	208	-	-	-	H1069Q/-
8	84	8,6	↑ (54)	4,7	3627_3630del.4/ H1069Q
9	54	4,7	↑ (46)	7,7	H1069Q/-
10	123	10,0	↑ (42)	3,5	H1069Q/H106Q
11	80	6,9	↑ (46)	4,8	H1069Q/H106Q
12	74	4,72	N (26)	3,5	H1069Q/-

Note: CP – ceruloplasmin concentration in blood serum in mg/l; TC – total copper in the blood in µmol/l; CNRC (calculated value) – copper not related to ceruloplasmin: ↑ – higher than normal (> 2.0 µmol/l) and in % of total copper content; CE – 24-hour copper excretion in µmol/day; M – identified mutations in the ATP7B gene: H1069Q/H106 –H1069Q homozygote, H1069Q/- – H1069Q heterozygote, 1770insT/H106Q – a combination of the H1069Q mutation and the 1770insT insertion in heterozygous states, 3627_3630del.4/ H1069Q – a combination of the H1069Q mutation and deletions 3627_3630del.4 in heterozygous states.

У всех пациентов в исследуемой группе (*n*=20) были обнаружены генетические аберрации в гене *ATP7B*: больные с гетерозиготными мутациями по H1069Q составили 60%, с гомозиготными мутациями по H1069Q – 30%, сочетание мутаций 3627_3630del.4 и H1069Q в гетерозиготной форме обнаружено у 5% пациентов, сочетание мутаций 1770insT и H1069Q в гетерозиготной форме также выявлено у 5% больных.

В настоящем исследовании распространенность мутации по H1069Q в гене *ATP7B* несколько выше по сравнению с другими работами. Так, в исследовании Г.М. Баязутдиновой и соавт. (2018 г.) среди пациентов с подтвержденным диагнозом БВК доля больных с мутацией по H1069Q в гетерозиготном состоянии составляет 50%, доля больных с мутацией по H1069Q в гомозиготном состоянии – 26,3%. Такое различие может быть обусловлено небольшой выборкой пациентов в настоящей работе [19].

В соответствии с проведенными ранее исследованиями большая часть пациентов с БВК являются компаунд-гетерозиготами, то есть имеют несколь-

ко различных мутаций в гене *ATP7B*. В настоящей работе суммарная доля компаунд-гетерозигот составила 70%, из них с помощью проводимой нами методики удалось верифицировать только 10%, что может быть связано с наличием у пациентов каких-либо других, более редких мутаций, не включенных в используемую генетическую панель [6, 10, 20].

В соответствии с последними Федеральными клиническими рекомендациями обнаружение одной гомозиготной мутации в гене *ATP7B* является достаточным критерием для постановки диагноза БВК. Обнаружение одной мутации в гетерозиготной форме, но без наличия дополнительных клинико-лабораторных данных не позволяет достоверно подтвердить БВК, однако является весомым аргументом в пользу диагноза. Выявление нескольких различных мутаций в гене *ATP7B* подтверждает диагноз БВК даже при отсутствии других клинико-лабораторных маркеров, входящих в Лейпцигскую количественную шкалу [10, 20, 21]. Исходя из вышесказанного, можно заключить, что в исследуемой выборке (n=20) у 40 % пациентов диагноз БВК мог бы быть поставлен на основании результатов используемой генетической панели даже без учета иных критериев заболевания.

По нашему мнению, секвенирование всей последовательности гена оправдано только в следующей ситуации: у пациента выявлена одна мутация в гетерозиготной форме в сочетании с отсутствием достаточного количества клинико-лабораторных маркеров БВК согласно Лейпцигской количественной шкале диагностики БВК.

Для 12 пациентов были собраны анамнестические, клинические и лабораторные данные. Средний возраст дебюта у обследуемых нами больных БВК составил 21±11 лет (M±σ) и варьировал от 6 до 47 лет. По данным других авторов, средний возраст манифестации заболевания составляет 11-25 лет. Возникновение первых клинических симптомов заболевания в возрасте до 5 лет и после 45 лет считается нехарактерным, но описано в литературе [4, 10, 22, 23] и находит подтверждение в нашем исследовании.

Для БВК характерен высокий уровень вариабельности и неспецифичности проявлений дебюта. У 75% наблюдаемых нами пациентов дебют заболевания проявлялся поражением печени различной степени тяжести: цитолитическим синдромом, нарушением пигментного обмена, холестазом, печеночно-клеточной недостаточностью, портальной гипертензией. Реже (у 17% пациентов) болезнь дебютировала неврологическими нарушениями, а патология печени была выявлена при целенаправленном обследовании. У одного пациента дебют заболевания включал в себя гемолитический криз (8%). По данным других авторов заболевание чаще всего манифестирует с появления симптомов поражения печени (в 40-60% случаев), на втором месте по частоте выступают неврологические симптомы (25–45%), гемолитический дебют чаще встречается у детей (в 10–15%) [13, 24–27]. Существенно чаще у обследованных нами больных неврологические нарушения встречались на момент установления диагноза (83%), из них у $^1/_3$ симптомы были представлены легким постуральным тремором рук и «ажурными» мозжечковыми нарушениями в виде легкой интенции при выполнении пальценосовой пробы, дисметрии, дисдиадохокинеза в верхних конечностях. Проявления были настолько нетяжелыми и непостоянными, что сами больные их не фиксировали, жалоб не предъявляли, и только осмотр невролога позволил верифицировать данные симптомы.

Полученные нами данные подчеркивают, что при наличии у пациента неспецифической неврологической симптоматики врачу-неврологу необходимо обращать внимание на признаки возможного поражения печени, которое у пациентов с БВК чаще предшествует поражению ЦНС. Кроме этого, при неясной картине поражения печени у лиц молодого возраста, диагноз БВК должен рассматриваться как один из возможных вариантов при проведении диагностического поиска.

Наиболее частыми симптомами среди пациентов с неврологическими проявлениями БВК были дисфония и дизартрия (50% случаев) смешанного характера (мозжечковая, гипокинетическая, спастическая), дисфагия (21%), сиалорея (50%), постурально-кинетический тремор (75%), мозжечковые симптомы – дисметрия, адиадохокинез, интенция в пальценосовой пробе (83%) и чуть реже – атаксия в пяточно-коленной пробе (42%), статико-локомоторная атаксия (58%), акинетико-ригидный синдром (42%) и фокально-генерализованная дистония (25%). Ранее проанализированные клинические наблюдения подтверждают высокую частоту встречаемости данных симптомов у пациентов с БВК [20, 24, 28]. Вторичная эпилепсия с генерализованными припадками зарегистрирована только у одного пациента (8%). По данным других исследований примерно у 6% больных (в 10 раз больше, чем в популяции) отмечаются эпилептические припадки [10].

У ряда наблюдаемых нами пациентов отмечена патология психической сферы (50%): нарушение в коммуникативной сфере, упрямство, инфантилизм, эйфоричность, эмоциональная неустойчивость, брадифрения. Частой была жалоба на снижение памяти (50%), в то время как объективизации по данным тестов (MMSE, FAB) выявлено не было. В одном случае у больного (8%) наблюдалось развитие шизофреноподобного состояния со слуховыми галлюцинациями и бредовыми расстройствами. Данные других авторов подтверждают многогранность психических расстройств при БВК: клинические проявления могут включать в себя аффективно-поведенческие нарушения (снижение настроения, плаксивость, эйфоричность, эмоциональную неустойчивость, расторможённость, раздражительность, депрессию), замедленность психических процессов, снижение психической активности, слабость побуждений, сужение круга интересов, насильственный плач и смех, деменция, развернутые психозы с продуктивной симптоматикой. Нейропсихические

симптомы присоединяются чаще во втором, третьем десятилетиях жизни, но могут проявляться и в детском возрасте [4, 24, 28].

У 50% пациентов на момент постановки диагноза определялись МРТ-признаки поражения головного мозга, наиболее часто встречающиеся при БВК: гиперинтенсивность сигнала в Т2 ВИ и FLAIR режимах в области базальных ядер (скорлупа, медиальный и латеральный бледные шары – 100%), в ножках мозга (50%), в мозжечке (17%) и у 2 человек (33%) выявлено сочетание очаговых изменений в базальных ганглиях и больших полушариях. У 33% больных с клиникой поражения ЦНС изменений на МРТ, характерных для БВК, выявлено не было. Полученные результаты согласуются с приведенными ранее наблюдениями: изменения МР-сигнала от структур головного мозга могут отсутствовать у 7-17% детей со смешанной формой болезни Вильсона при наличии неврологической симптоматики в виде тремора, дизартрии и изменений мышечного тонуса по экстрапирамидному типу. В то же время, по данным других авторов, изменения на МРТ головного мозга могут опережать развитие неврологической симптоматики в 10% случаев БВК и уменьшаться на фоне патогенетической терапии [28]. Таким образом, МРТ-картина головного мозга может являться весомым, но не абсолютным аргументом в пользу подтверждения или исключения БВК и должна анализироваться в сочетании с другими критериями постановки диагноза.

По характеру изменений печени в структуре описываемых пациентов преобладали больные с циррозом печени (67%), меньшую долю составили лица с хроническим гепатитом (25%). Фульминантная печёночная недостаточность зарегистрирована у одной пациентки в возрасте 14 лет (8%). Полученные данные находят подтверждение других авторов [10, 28–30]: поражение печени при БВК часто протекает латентно, умеренно изменённые лабораторные показатели не соответствуют выраженным морфологическим изменениям паренхимы органа, явные клинические симптомы патологии печени появляются на продвинутой стадии заболевания, в связи с чем молодым пациентам ставят нозологический диагноз уже на стадии необратимых изменений печени с присоединившейся неврологической симптоматикой. Фульминантное течение печеночной недостаточности чаще встречается у детей и молодых людей и характеризуется гемолитической анемией с отрицательной пробой Кумбса и признаками внутрисосудистого гемолиза, прогрессирующей желтухой, асцитом, коагулопатией, почечной недостаточностью.

Среди наблюдаемых нами пациентов кольцо Кайзера-Флейшера на момент постановки диагноза БВК встречалось у большей части больных (83%). Среди больных с неврологической симптоматикой только в одном наблюдении (8%) кольца выявлено не было. Полученные данные согласуются с данными литературы: кольцо Кайзера-Флейшера обнаруживается у 90% больных с неврологической симптоматикой, которая чаще развивается уже после появления клинической картины поражения печени. В структуре пациентов с абдоминальной формой болезни 50-60% не имеют кольца Кайзера-Флейшера. Стоит отметить, что данный симптом редко, но может встречаться при других патологиях печени, сопровождающихся холестазом [10].

Исследование метаболизма меди показало, что только в 55% случаев концентрация церулоплазмина в крови была ниже диагностического порога – 100 мг/л. У 1 (9%) обследуемого концентрация церулоплазмина плазмы до начала патогенетической терапии оставалась в пределах нормальных значений (>200 мг/л). Данные других авторов подтверждают возможность отсутствия снижения уровня церулоплазмина у пациентов с БВК, в частности в связи с повышением его синтеза как белка острой фазы [10, 20]. В 80% случаев уровень меди, не связанной с церулоплазмином или «токсичной» фракции меди (расчетный показатель), был существенно выше нормы, средний показатель данной фракции составил 3,7±2,3 мкмоль/л (M±σ) или 48% от уровня общей меди при норме менее 2,0 мкмоль/л и менее 10% соответственно. В 90% случаев отмечена гиперкупрурия, показатели которой превышали верхний порог более чем в 2 раза. Стоит отметить, что увеличение уровня свободной меди в крови, а также суточной экскреции меди с мочой встречается также при других заболеваниях печени, например, при аутоиммунном гепатите [20].

Разница между возрастом постановки диагноза БВК и возрастом дебюта заболевания среди обследованных пациентов составила от нескольких дней до 21 года. В 42% случаев диагноз был верифицирован в первый год от начала клинических проявлений заболевания, в 25% – спустя 1-3 года и в 33% случаев диагноз был поставлен по происшествии более трех лет от первой клинической манифестации. У 2 больных с печеночным дебютом диагноз БВК был подтвержден при появлении у них неврологической симптоматики спустя 12 и 21 год. Клинические наблюдения Т.С. Мищенко и И.К. Волошина-Гапонова подтверждают проблему поздней верификации БВК: диапазон между манифестацией заболевания и постановкой нозологического диагноза колеблется от 0 до 7 лет. У некоторых больных до постановки БВК диагноз менялся до 4 раз [24].

Таким образом, клинический симптомокомплекс БВК не является строго очерченным, а типичное для БВК сочетание поражения печени и нервной системы, колец Кайзера-Флейшера присутствует далеко не у всех больных или появляется уже на поздних стадиях заболевания. Наличие значительного количества ложноотрицательных результатов исследования лабораторных маркеров БВК говорит о недостаточной чувствительности данных методов исследования. Вариабельность клинических проявлений и результатов определения лабораторных маркеров БВК задерживает постановку этиологического диагноза и начало патогенетической терапии.

Использование разработанной генетической панели определения мутаций в гене *ATP7B* позволило выявить аберрации у всех пациентов, включенных в исследование. Предложенная методика генетической диагностики БВК имеет ряд преимуществ: производится тестирование только на мутации, которые наиболее часто встречаются в российской популяции, что позволяет рационализировать временные и экономические затраты, сделать исследование более доступным для пациента. Таким образом, данную диагностику рекомендуется проводить у всех пациентов с подозрением на печеночную, неврологическую или смешанную форму БВК с целью своевременной постановки диагноза и начала лечения.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (соглашение № 16-15-10203).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. P de Bie, P Muller, C Wijmenga, L W J Klomp Molecular pathogenesis of Wilson and Menkes disease: correlation of mutations with molecular defects and disease phenotypes. Journal of Medical Genetics. 2007;44(11):673-688. DOI: 10.1136/jmg.2007.052746.
2. Ala A., Walker A.P., Ashkan K., Dooley J.S., Schilsky M.L. Wilson's disease. The Lancet. 2007;369 (9559):397-408. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)60196-2.
3. Баязутдинова Г.М., Щагина О.А. Молекулярный патогенез болезни Вильсона-Коновалова. Медицинская генетика. 2017;16(7):8-24. [Bayazutdinova G.M., Shchagina O.A. Molecular pathogenesis of Wilson-Konovalov disease. Meditsinskaya genetika. 2017;16(7):18-24. (in Russian)].
4. Голубева В.В., Мазурчик Н.В., Гарабова Н.И., Ноздрюхина Н.В., Струценко А.А. Два случая болезни Вильсона-Коновалова. Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2013;(3):41–46. [Golubeva V.V., Mazurchik N.V., Garabova N.I., Nozdryukhina N.V., Strutsenko A.A. Two cases of Wilson-Konovalov disease. Nevrologiya, neyropsikhiatriya, psikhosomatika. 2013;(3):41–46. (in Russian)]. DOI: 10.14412/2074-2711-2013-2339.
5. Lutsenko S., Barnes N.L., Bartee M.Y. and Dmitriev O.Y. Function and regulation of human copper-transporting ATPases. Physiological Reviews. 2007;87(3):1011-1046. DOI: 10.1152/physrev.00004.2006.
6. Балашова М.С., Соловьева О.В., Фастовец С.В., Тулузановская И.Г., Филимонов М.И., Баязутдинова Г.М. и др. Клиническая ценность секвенирования гена ATP7B в диагностике болезни Вильсона-Коновалова. Медицинская генетика. 2016;15(7):14-16. [Balashova M.S., Solov'eva O.V., Fastovets S.V., Tuluzanovskaya I.G., Filimonov M.I., Bayazutdinova G.M. et al. The clinical value of sequencing of the ATP7B gene in the diagnosis of Wilson-Konovalov disease. Meditsinskaya genetika. 2016;15(7):14-16. (in Russian)]. DOI: 10.1234/XXXX-XXXX-2016-7-14-16.
7. Panagiotakaki E., Tzetis M., Manolaki N., Loudianos G., Athanasios P., Manesis E. et al. Genotype–Phenotype Correlations for a Wide Spectrum of Mutations in the Wilson Disease Gene (ATP7B). American Journal of Medical Genetics. 2004; 131A (2):168-173. DOI: 10.1002/ajmg.a.30345.
8. Stapelbroek J., Bollen C., van Amstel P., van Erpecum K., van Hattum J., van den Berg L., Klomp L., Houwen R. The H1069Q mutation in ATP7B is associated with late and neurologic presentation in Wilson disease: results of a meta-analysis. Journal of Hepatology. 2004;41(5):758–763. DOI: 10.1016/j.jhep.2004.07.017.
9. Ferenci P. Regional distribution of mutations of the ATP7B gene in patients with Wilson Disease: impact on genetic testing. Human Genetics. 2006;120(2):151-159. DOI: 10.1007/s00439-006-0202-5.
10. Еремина Е.Ю. Болезнь Вильсона-Коновалова. Вестник современной клинической медицины. 2011;4(1):38-46. [Eremina E. Yu. Wilson-Konovalov disease. Vestnik sovremennoy klinicheskoy meditsiny. 2011;4(1):38-46. (in Russian)].
11. Gow P.J., Smallwood R.A., Angus P.W, Smith A.L, Wall A.J., Sewell R.B. Diagnosis of Wilson's disease: an experience over three Decades. Gut. 2000;46(3):415-419. DOI: 10.1136/gut.46.3.415.
12. Perri R.E., Hahn S.H., Ferber M.J., Kamath P.S. Wilson Disease-keeping the bar for diagnosis raised. Hepatology.2005;42(4):974. DOI: 10.1002/hep.20893.
13. Козлова Н.М., Гвак К.В., Гаджибалаева Л.Ш. Болезнь Вильсона-Коновалова. Сибирский медицинский журнал. 2011;104(5):125-129. [Kozlova N.M., Gvak K.V., Gadzhibalaeva L. Sh. Wilson-Konovalov disease. Sibirskiy meditsinskiy zhurnal. 2011;104(5):125-129. (in Russian)].
14. Ferenci P., Caca K., Loudianos G., Mieli-Vergani G., Tanner S., Sternlieb I., Schilsky M., Cox D., Berr F. Diagnosis and phenotypic classification of Wilson disease. Liver International. 2003;23(3):139-142. DOI: 10.1034/j.1600-0676.2003.00824.x.
15. Roberts E.A., Schilsky M.L. A practice guideline on Wilson disease. Hepatology. 2003;37(6):1475-1492. DOI: 10.1053/jhep.2003.50252.
16. Tanzi R.E., Petrukhin K., Chernov I., Pellecuer J.L., Wasco W., Ross B. et al. The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. Nature Genetics. 1993;5(4):344-350. DOI: 10.1038/ng1293-344.
17. Walshe J.M. Wilson's disease: the importance of measuring serum caeruloplasmin non-immunologically. Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine. 2003;40(2):115-121. DOI: 10.1258/000456303763046021.
18. Jawdat N. Gaaib, Adnan F. Nassief. And Akeel H. Al-Assi Simple salting – out method for genomic DNA extraction from whole blood. Tikrit Journal of Pure Science. 2011;16(2):1813-662.
19. Баязутдинова Г.М., Щагина О.А., Поляков А.В. Мутация c.3207C>A гена ATP7B – наиболее частая причина гепатолентикулярной дегенерации в России: частота и причина распространения. Медицинская генетика. 2018;17(4):25-30. [Bayazutdinova G.M., Shchagina O.A., Polyakov A.V. The mutation p. 3207C> A of the ATP7B gene is the most common cause of hepatolenticular degeneration in Russia: frequency and cause of spread. Meditsinskaya genetika. 2018;17(4):25-30. (in Russian)] DOI: 10.25557/2073-7998.2018.04.25-30.
20. Асанов А.Ю., Соколов А.А., Волгина С.Я., Горячева Л.Г., Густов А.В, Иванова-Смоленская И.А. и др. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению болезни Вильсона-Коновалова (гепатолентикулярная дегенерация). Москва – 2015:5-71 [Asanov A.Yu., Sokolov A.A., Volgina S.Ya., Goryacheva L.G., Gustov A.V, Ivanova-Smolenskaya I.A. et al. Federal clinical guidelines for the diagnosis and treatment of Wilson-Konovalov disease (hepatolenticular degeneration). Moscow – 2015:5-71. (in Russian)].
21. Ferenci P., Czlonkowska A., Stremmel W., Houwen R., Rosenberg W., Schilsky M.. EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease. Journal of Hepatology. 2012;56 (3):671-685. DOI: 10.1016/j.jhep.2011.11.007.
22. Залялова З.А. Современные подходы к диагностике и лечению болезни Вильсона-Коновалова. Казанский медицинский журнал. 2003;82(2):154-155. [Zalyalova Z.A. Modern approaches to the diagnosis and treatment of Wilson-Konovalov disease. Kazanskiy meditsinskiy zhurnal. 2003;82(2):154-155. (in Russian)].
23. Pilloni L., Lecca S., Coni P., Demelia L., Pilleri G., Spiga E. et al. Wilson's disease with late onset. *Digestive and Liver Disease.* 2000;32(2):180. DOI: 10.1016/S1590-8658(00)80408-9.
24. Мищенко Т.С., Волошин-Гапонов И.К. Современные аспекты болезни Вильсона. Международный неврологический

журнал. 2015;2(72):20-23. [Mishchenko T.S., Voloshin-Gaponov I.K. Modern aspects of Wilson's disease. *Mezhdunarodnyy nevrologicheskiy zhurnal.* 2015;2 (72):20-23. (in Russian)].
25. Егорова А.Т., Базина М.И., Маисеенко Д.А., Киселева Е.Ю., Царюк Е.П. Болезнь Вильсона-Коновалова и беременность. Сибирское медицинское обозрение. 2014;1(85):89-92. [Egorova A.T., Bazina M.I., Maiseenko D.A., Kiseleva E.Yu., Tsaryuk E.P. Wilson-Konovalov disease and pregnancy. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie.* 2014;1(85):89-92. (in Russian)].
26. Sharma S., Toppo A., Rath B., Harbhajanka A., Lalita Jyotsna P. Hemolytic Anemia as a Presenting Feature of Wilson's Disease. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion.* 2010;26(3):101–102. DOI: 10.1007/s12288-010-0034-2.
27. Мельникова М.Ю., Федорова Т.Ф., Лобзин С.В., Панина Е.Б., Стельмах В.В., Некрасова А.С. и др. Геморрагический синдром при гепатолентикулярной дегенерации: клинические особенности. Неврологический журнал. 2014;19(6): 23-30. [Mel'nikova M.Yu., Fedorova T.F., Lobzin S.V., Panina E.B., Stel'makh V.V., Nekrasova A.S. et al. Hemorrhagic syndrome in hepatolenticular degeneration: clinical features. *Nevrologicheskiy zhurnal.* 2014;19(6):23-30. (in Russian)].
28. Баранов А.А., Намазова-Баранова Л.С., Потапов А.С., Полякова С.И., Цымбалова Е.Г., Четкина Т.С. и др. Федеральные клинические рекомендации по оказанию медицинской помощи детям с болезнью Вильсона. Москва – 2015: 3-21. [Baranov A.A., Namazova-Baranova L.S., Potapov A.S., Polyakova S.I., Tsymbalova E.G., Chetkina T.S. Federal clinical guidelines for the provision of medical care for children with Wilson's disease. Moscow – 2015; 3-21. (in Russian)].
29. Сухарева Г.В. Гепатолентикулярная дегенерация и варианты поражения печени. Лечение и профилактика. 2012;2(3):36-41. [Suhareva G.V. Hepatolenticular degeneration and variants of liver damage. *Lechenie i profilaktika.* 2012;2(3):36-41. (in Russian)].
30. Денисова М.Ф., Донде С.М., Дыба М.Б., Музыка Н.Н., Реминная Н.Т., Чернега Н.В. Клинические варианты печеночной формы болезни Вильсона-Коновалова у детей. Перинатология и педиатрия. 2013;3(55):70-73. [Denisova M.F., Donde S.M., Dyba M.B., Muzyka N.N., Reminnaya N.T., Chernega N.V. Clinical variants of the hepatic form of Wilson-Konovalov disease in children. *Perinatologiya i pediatriya.* 2013;3(55):70-73. (in Russian)].

Поступила 12.05.19
Принята к печати 25.05.19

Метаданные

1. *Гернер Е.А.* – студент VI курса лечебного факультета ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия
Gerner E.A. – student of 6th year, First St. Petersburg I. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russia
2. *Назаров В.Д.* – младший научный сотрудник лаборатории диагностики аутоиммунных заболеваний, Научно-методический центр по молекулярной медицине Министерства здравоохранения РФ ФГБОУ ВО «Первый Санкт- Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия
Nazarov V.D., Research Fellow, Laboratory of Autoimmune Diagnostics, Center for Molecular Medicine, First St. Petersburg I. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russia
3. *Федорова Т.Ф.* – к.м.н., заведующий отделением восстановительного лечения, врач-невролог ФГБУЗ «Санкт-Петербургская клиническая больница российской академии наук», Санкт-Петербург, Россия
Fedorova T.F. – PhD (Medicine), Head, Federal State Budgetary Healthcare Institution «St. Petersburg clinical hospital of the Russian Academy of Sciences» St. Petersburg, Russia
4. *Лапин С.В.* – к.м.н., заведующий лабораторией диагностики аутоиммунных заболеваний, Научно-методический центр по молекулярной медицине Министерства здравоохранения РФ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия
Lapin S.V., PhD (Medicine), Head, Laboratory of Autoimmune Diagnostics, Center for Molecular Medicine, First St. Petersburg I. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation
5. *Павлова Т.А.* – заведующий неврологическим отделением №1, врач-невролог ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова», Санкт-Петербург, Россия
Pavlova T.A. – Head, neurology department #1, Neurologist, Federal State Budgetary Institution «Almazov National Medical Research Centre» of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia
6. *Новиков С.А.* – д.м.н., профессор кафедры офтальмологии ПСПбГМУ имени академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия
Novikov S.A., PhD, MD (Medicine), Professor of ophthalmology department, The First St. Petersburg I. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russia
7. *Алексеева Т.М.* – д.м.н., заведующая кафедрой неврологии и психиатрии, врач-невролог ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова», Санкт-Петербург, Россия
Alekseeva T.M. – PhD, MD (Medicine), Head, neurology department #3, Neurologist, Federal State Budgetary Institution «Almazov National Medical Research Centre» of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia
8. *Эмануэль В.Л.* – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия
Emanuel V.L., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Clinical Laboratory Diagnostics with a Course of Molecular Medicine, The First St. Petersburg I. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russia
9. *Панина Е.Б.* – к.м.н., доцент кафедры неврологии и психиатрии, врач-невролог ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова», Санкт-Петербург, Россия
PhD (Medicine), associate Professor of neurology and psychiatry, Neurologist, Federal State Budgetary Institution «Almazov National Medical Research Centre» of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia