

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
АКУШЕРСТВА, ГИНЕКОЛОГИИ И ПЕРИНАТОЛОГИИ ИМЕНИ
АКАДЕМИКА В. И. КУЛАКОВА» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи



Исаева Медан Хасановна

**Клинико-лабораторные, ультразвуковые и молекулярно-генетические
предикторы эффективности лечения и выживаемости детей
с нативной печенью при билиарной атрезии**

3.1.21. Педиатрия

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Дегтярева Анна Владимировна

доктор биологических наук, профессор

Ребриков Денис Владимирович

Москва – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1 Общая характеристика нозологии.....	14
1.2 Проявления билиарной атрезии у новорожденных и детей первых месяцев жизни.....	24
1.3 Неинвазивные маркеры фиброза и цирроза печени у детей с билиарной атрезией	27
1.4 Предикторы исхода операции Касаи у детей с билиарной атрезией.....	29
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	34
2.1 Материалы исследования.....	34
2.2 Методы исследования	40
2.2.1. Лабораторные методы исследования.....	41
2.2.2. Инструментальные методы исследования	41
2.2.3. Молекулярно-генетические исследования.....	43
2.2.4. Биоинформатическая обработка	44
2.2.5. Полноэкзомный поиск ассоциаций.....	45
2.2.6. Функциональный анализ обогащения	45
2.3 Методы статистической обработки данных.....	46
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ	49
3.1 Клинические симптомы билиарной атрезии и сроки их манифестации в неонатальный период	49
3.2 Выживаемость детей с нативной печенью после операции Касаи и частота развития осложнений в группе детей с эффективной портоэнтеростомией.....	58
3.3 Неинвазивные маркеры фиброза и цирроза печени у детей с билиарной атрезией	64
3.4 Результаты полноэкзомного поиска ассоциаций среди пациентов с	

билиарной атрезией и анализ влияния молекулярно-генетических маркеров на исход операции Касаи	72
3.5 Прогностическая модель эффективности лечения и выживаемости с нативной печенью у детей с билиарной атрезией	85
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	98
ВЫВОДЫ	112
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	114
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	115
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	116
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	118

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В структуре заболеваний гепатобилиарной системы у детей первых месяцев жизни билиарная атрезия (БА) составляет 45% и занимает ведущее место [2]. Согласно исследованиям отечественных и зарубежных авторов БА является наиболее частым показанием для проведения трансплантации печени (ТП) в детском возрасте [10, 166]. Во всем мире портоэнтеростомия (ПЭ, КРЕ, операция Касаи) признана золотым стандартом лечения билиарной атрезии. В ходе данной операции удаляют облитерированные желчные протоки и восстанавливают отток желчи по желчевыводящим путям [196]. Основными критериями эффективности оперативного вмешательства при БА являются: появление окрашенного стула, купирование желтухи и снижение уровня общего билирубина < 34 мкмоль/л в течение 3–6 месяцев после операции [15, 162, 163, 204].

Эффективность оперативного вмешательства широко варьирует – 36–87,2% [134, 190, 206]. При неэффективности ПЭ требуется проведение ТП в течение 6–12 месяцев после операции, либо наступает летальный исход вследствие печеночной недостаточности [37, 80, 106, 171, 178]. На сегодняшний день не все факторы, которые могут определять эффективность хирургического лечения полностью изучены.

Во всем мире значимой и актуальной проблемой остается поздняя диагностика заболевания. Несвоевременное выявление БА может не только ухудшить прогноз, но и увеличить риск осложнений, наиболее грозным среди которых является геморрагический синдром различной локализации, внутричерепные кровоизлияния, которые носят необратимый характер даже при восстановлении функции печени после проведения ТП [4, 14]. При своевременной диагностике и введении препарата витамина К осложнение в виде геморрагического синдрома у детей с БА является предотвратимым [23]. В связи с чем изучение клинических, лабораторных и ультразвуковых проявлений

заболевания в ранний неонатальный период является актуальной задачей для своевременной диагностики БА.

Более того, возраст на момент проведения операции Касаи является важным, но не единственным фактором, определяющим исход оперативного лечения [12, 37, 77]. Ряд исследований посвящен изучению уровня как предоперационных, так и послеоперационных лабораторных, ультразвуковых данных и результатов морфологического исследования биоптата печени и выявления предикторов эффективности оперативного вмешательства. Но полученные данные противоречивы и сильно варьируют [41, 164, 165, 180, 191, 207].

Появление и распространение современных молекулярно-генетических методов исследования внесли вклад в понимание генетических аспектов в развитии билиарной атрезии. В литературе описаны результаты проведенных анализов генов-кандидатов, полногеномный поиск ассоциаций (GWAS, genome-wide association studies), исследования числа копий генов (CNV, copy number variation), секвенирование экзома (WES, whole exome sequencing) [1, 71, 82, 84, 173] для выявления этиологических аспектов заболевания. В связи с фенотипической гетерогенностью БА индивидуальные генетические особенности каждого пациента могут играть существенную роль в тяжести течения заболевания и эффективности хирургической коррекции. Однако в настоящее время недостаточно изучено влияние генетических факторов на исход хирургического лечения.

Остается открытым вопрос выявления неинвазивных маркеров выраженного фиброза и цирроза печени у детей с БА, так как прогрессирование фиброза печени после проведения операции Касаи и возникающие вследствие этого осложнения определяют выживаемость с нативной печенью и позволяют своевременно определить показания к проведению трансплантации печени [56].

Из вышеизложенного следует, что тема исследования является актуальной и включает в себя выявление предикторов эффективности операции Касаи на основании комплексного анализа клинических, ультразвуковых и молекулярно-генетических параметров.

Степень разработанности темы исследования

БА – это прогрессирующая холангиопатия внутри и внепеченочных желчных протоков. При отсутствии своевременного лечения летальный исход наступает в течение первых 2 лет жизни. Этиология заболевания до конца не изучена. ПЭ (операция Касаи) является основным методом лечения, носит паллиативный характер и позволяет продлить жизнь с нативной печенью. При неэффективности операции Касаи проводится ТП.

Принцип операции заключается в удалении облитерированных желчных протоков для обеспечения оттока желчи в кишечник, что, в свою очередь, позволяет предотвратить дальнейшее прогрессирование заболевания. Исход операции не всегда благоприятный и эффективность широко варьирует, примерно в 32–59% случаев удается продлить жизнь с нативной печенью до 5 и 10 лет в 27–52% случаев [34, 35, 152].

На сегодняшний день проведено ряд исследований с целью выявления факторов, определяющих исход операции. Среди них выделяют: возраст на момент проведения ПЭ [77], опыт хирургического центра [205], наличие у ребенка сопутствующих аномалий [153], анатомический тип билиарной атрезии [191], а также использование стероидной терапии в послеоперационном периоде [206].

Определены варианты генов у больных с БА, установлена их связь с исходом ПЭ, но, учитывая немоногенный характер заболевания, нет однозначного понимания влияния генетических факторов как в этиологии, так и на исход лечения у пациентов. Данные, полученные в проведенных исследованиях, противоречивы, и на сегодняшний день отсутствует единая концепция в понимании предикторов исхода ПЭ.

Известно, что БА при неэффективности ПЭ быстро прогрессирует и приводит к формированию цирроза печени (ЦП), что требует проведения ТП в короткие сроки. Выявление предикторов эффективности ПЭ позволит своевременно направить ребенка в центр трансплантологии, обеспечить подбор и

подготовку донора, позволит оптимизировать терапию, профилактические мероприятия и провести консультирование, обучение родителей.

Вышесказанное определяет цель настоящего исследования и подчеркивает перспективность изучаемой темы по выявлению предикторов эффективности ПЭ у детей с БА.

Цель исследования

Оптимизировать тактику ведения детей с билиарной атрезией на основании клинико-лабораторных, ультразвуковых и молекулярно-генетических предикторов эффективности лечения и выживаемости.

Задачи исследования

1. Определить сроки проявления клинико-лабораторных и ультразвуковых признаков билиарной атрезии и разработать алгоритм обследования новорожденных в раннем неонатальном периоде.

2. Оценить выживаемость детей с нативной печенью при билиарной атрезии после операции Касаи, изучить частоту развития осложнений в группе детей с успешной портоэнтеростомией.

3. Выявить неинвазивные маркеры фиброза и цирроза печени у детей с билиарной атрезией.

4. Проанализировать данные высокопроизводительного секвенирования экзома у детей с билиарной атрезией и определить влияние генетических факторов на исход операции Касаи.

5. Разработать прогностическую модель эффективности лечения билиарной атрезии методом Касаи.

Научная новизна

Впервые методом полноэкзомного секвенирования выявлены и описаны новые генетические варианты, характерные для детей с БА, также проведен полноэкзомный анализ ассоциаций, в котором сравнивались пациенты с БА (разделенные на группы «эффективная операция» и «неэффективная операция») и контрольные образцы.

Установлено, что холестерин является одним из наиболее чувствительных маркеров эффективности операции Касаи в послеоперационном периоде. С использованием современных статистических методов анализа разработана прогностическая модель эффективности операции Касаи, которая позволяет в ранний послеоперационный период определить эффективность ПЭ.

В современных условиях научно обоснованы и определены неинвазивные лабораторные и ультразвуковые маркеры фиброза и цирроза печени у детей с БА. Впервые разработан алгоритм обследования новорожденного для ранней диагностики БА на основании изучения основных клинических симптомов заболевания и сроков их манифестации в ранний неонатальный период на представительной группе пациентов при редком заболевании.

Теоретическая и практическая значимость исследования

В исследовании методом построения прогностической модели показано, что наиболее чувствительными предикторами эффективности операции Касаи являются: степень выраженности фиброза печени, оцененная при проведении гистологического исследования биоптата печени, уровень прямого билирубина в сочетании с холестерином, оцененные на 14±3-и сутки после операции, наличие рудиментированного желчного пузыря до операции.

Изучена частота эффективности операции Касаи в России с использованием общепризнанных критериев оценки эффективности ПЭ.

Проведена оценка выживаемости с нативной печенью у детей с БА после проведения операции Касаи, более того, определена частота и структура послеоперационных осложнений.

Выявлены неинвазивные лабораторные и ультразвуковые маркеры выраженности фиброза и цирроза печени у детей раннего возраста с БА.

Методом полноэкзомного секвенирования обнаружены и описаны генетические варианты, характерные для больных БА, также определены варианты, характерные для детей с эффективной и неэффективной ПЭ.

Изучены ранние клинические симптомы БА и сроки их манифестации в неонатальный период, и, на основании полученных данных, разработан алгоритм обследования новорожденных для ранней диагностики заболевания.

Методология и методы исследования

Методологической основой для проведения настоящего исследования стали работы зарубежных и отечественных авторов по данной теме исследования. В исследование было включено 170 детей с установленным диагнозом БА после проведения операции Касаи.

Основные положения, выносимые на защиту

1. В раннем неонатальном периоде наиболее чувствительными маркерами БА являются: повышение прямой фракции билирубина $> 17,1$ мкмоль/л, отсутствие визуализации или уменьшение просвета желчного пузыря по данным УЗИ, проведенного после 4-часовой голодной паузы. В то время как ахоличный стул, выявляемый после отхождения мекония, гепатоспленомегалия, а также ультразвуковые критерии в виде изменения эхоструктуры и симптом треугольного рубца в ранний неонатальный период выявляются редко.

2. У детей с БА после проведения операции Касаи наиболее частым осложнением в течение 1 года после операции является бактериальный холангит,

который встречается в 78,9% случаев, а к 3–5 гг. после оперативного вмешательства частота его снижается до 23,3%. Обратная тенденция отмечается по частоте развития портальной гипертензии: на 1 году составляет – 34,7%, через 3–5 лет после операции увеличивается до 56,3%.

3. Неинвазивными маркерами, отражающими степень выраженности фиброза/цирроза печени (F3-4) у детей с БА, являются: возраст, индекс APRI, а также такие ультразвуковые параметры как: длина селезенки, диаметр печеночной артерии, индекс резистентности печеночной артерии, индекс $D_{\text{опа}}/D_{\text{вв}}$. Вероятность выраженности фиброза/цирроза печени увеличивается при значениях индекса APRI > 1,52.

4. Вероятной генетической предпосылкой для развития БА является совокупность аллельных состояний генов, включенных в сигналинг иммунной системы: варианта rs368030585 гена *LOC105379749*, а также варианта rs201589859 гена *POTE1* ассоциированы с риском развития БА. Наличие варианта rs200315308 в гене *ANKRD30A* у детей с билиарной атрезией ассоциировано с высокой эффективностью операции Касаи; напротив, вариант rs5862681 в гене *GYPB*, вариант rs62513923 в гене *PABPC1* и вариант rs2599972 в гене *CCDC74B* ассоциированы с неэффективностью данного хирургического вмешательства.

5. Выявление «рудиментированного» желчного пузыря по данным УЗИ, минимально выраженные признаки фиброза печени по данным гистологического исследования биоптата печени, оцененной интраоперационно, наряду со скоростью снижения прямого билирубина и холестерина на 14±3-и сутки после операции позволяют с высокой вероятностью предполагать эффективность хирургической коррекции БА.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность результатов данного исследования подтверждается количеством пациентов, включенных в исследование (170), использование

молекулярно-генетических методов исследования, а также современными методами статистической обработки данных.

Основные результаты исследования, проведенного в рамках данной диссертации, были доложены и представлены на XIII, XIV и XV Всероссийских образовательных конгрессах «Анестезия и реанимация в акушерстве и неонатологии» (Москва, 2020, 2021, 2022), на второй научно-практической онлайн-конференции «Новые технологии в диагностике и лечении наследственных болезней» (Москва, 2020), на XVII Российском онлайн конгрессе «Педиатрия и детская хирургия в Приволжском федеральном округе» (2020), на Научно-практической конференции третьего Всероссийского педиатрического форума студентов и молодых ученых с международным участием (Москва, 2022), на VII Всероссийской мультимедийной научно-практической конференции «Актуальные вопросы современной перинатологии: сложный случай» (2021), а также на международных конгрессах: IV Joint European Neonatal Societies Congress (2021), II International Congress on Biliary Atresia and related Diseases (BARD-Bruges-2022). Полученные результаты исследования были представлены на заседании Института неонатологии и педиатрии ФГБУ «НМИЦ АГП им. Академика В. И. Кулакова» Минздрава РФ для их оценки и официального утверждения.

Личный вклад автора

Исследование было организовано и проведено автором, который лично принимал участие в лечебно-диагностических мероприятиях, собирал первичные клиничко-лабораторные данные, анализировал и интерпретировал полученные результаты. В рамках исследования были проведены ретроспективный анализ медицинской документации и проспективное исследование в соответствии с запланированным планом обследования и наблюдения за детьми. Автор лично присутствовал при проведении оперативных вмешательств и принимал участие в обследовании и лечении детей, проспективно включенных в исследование. В целом, автор выполнил полный комплекс работ, связанных с организацией и

проведением исследования, включая определение целей и задач, разработку дизайна, сбор данных, анализ и интерпретацию результатов.

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 п. 3 – Оптимизация научно-исследовательских подходов и практических принципов ведения – диагностики, профилактики, лечения, а также сопровождения детей с хроническими болезнями, подвергшихся воздействию внешних факторов; п. 5 – Разработка практических подходов к ведению детей с врожденными пороками развития.

Внедрение результатов исследования в практику

Полученные результаты научно-исследовательской работы были внедрены в клиническую практику отдела педиатрии Института неонатологии и педиатрии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России, а также в работу торакального хирургического отделения ГБУЗ ДГКБ им. Н. Ф. Филатова.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 5 печатных работ, в том числе 3 научные статьи, отражающие основные результаты диссертации: 1 статья опубликована в журнале, включенном в международные базы Scopus и Web of Science. 2 статьи – в журналах, включенных в международную базу Scopus; 1 статья обзорная опубликована в журнале, включенном в Перечень рецензируемых научных изданий Университета / Перечень ВАК при Минобрнауки России; 1 публикация в сборниках материалов всероссийской научной конференции.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 140 страницах, состоит из введения, трех глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 218 источников из них 11 отечественных и 207 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 23 рисунками и 24 таблицами.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общая характеристика нозологии

Билиарная атрезия (БА) – это воспалительная и фиброзирующая облитерация внепеченочных желчных протоков с постепенным вовлечением в процесс внутрипеченочной желчной системы и формированием БЦ печени [196]. Большинство случаев билиарной атрезии встречается в несиндромальной (перинатальной/изолированной) форме, которая составляет около 85% всех случаев заболевания. Эмбриональная (синдромальная) форма, встречается реже, примерно в 10–15% случаев и в 5–8% случаев может быть выявлена кистозная форма БА [1].

В зависимости от географического расположения частота возникновения билиарной атрезии в популяции варьирует от 1:8000 человек (в Азии и Африке) до 1:18000 человек в Европе. Заболевание чаще диагностируется у девочек [34, 69]. Клинически БА проявляется неонатальным холестазом. У детей первых месяцев жизни требуется проведение дифференциальной диагностики с обширной группой врожденных и наследственных заболеваний, которые могут протекать под маской БА [3,11]. Для подтверждения диагноза необходимо проведение морфологического исследования биоптата печени и желчного протока во время операции. Лечение включает хирургическую коррекцию и трансплантацию печени, которые позволяют повысить общую выживаемость детей с БА до 90% [3, 7, 9, 11]. Причины возникновения билиарной атрезии, а также факторы, определяющие эффективность лечения, до сих пор не до конца изучены. Среди этиопатогенетических механизмов выделяют такие факторы как: генетическая предрасположенность, иммунные нарушения и воздействие внешних факторов, таких как вирусы и токсины. Множество научных исследований указывают на значимую роль факторов иммунной дисрегуляции в этиологии заболевания. БА – это фибровоспалительное заболевание, которое проявляется инфильтрацией воспалительными клетками, избыточной экспрессией цитокинов и/или хемокинов

при морфологическом исследовании биоптатов печени больных. В иммунопатогенезе БА ключевую роль играет врожденный иммунный ответ, который активирует НК-клетки и субпопуляцию Т-хелперов 1-го типа, известную как Th1-тип ответ адаптивного иммунитета. Этот процесс привлекает эффекторные Т-клетки и приводит к воспалению и обструкции. [1, 111]. Кроме того, отмечается уменьшение числа Treg-клеток, которые оказывают подавляющее воздействие на воспаление. После возникновения обструкции желчных путей, иммуноопосредованное повреждение сохраняется, даже если отток желчи был восстановлен. Это происходит из-за активации иммунных ответов Th2 и Th17 [141]. После трансплантации печени рецидивы заболевания не наблюдаются, в отличие от других иммунных заболеваний желчных протоков [1, 184].

Повреждение эпителия желчных протоков, вызванное вирусами или токсинами, может привести к образованию новых эпитопов антигенов, которые могут инициировать или усилить аутоиммунное воспаление [141, 213]. Рассматриваются различные вирусы, которые могут играть роль в возникновении заболевания, в том числе цитомегаловирус (ЦМВ), вирус папилломы человека (ВПЧ), вирус герпеса 6-го типа, вирус Эпштейна – Барр (ЭБВ), реовирус и ротавирус [33]. В некоторых исследованиях с применением ПЦР на вирусные ДНК/РНК или иммуноокрашивания на вирусные IgM+ или белок Mx были обнаружены следы перенесенной вирусной инфекции в образцах тканей печени, но не во всех [54, 108]. На данный момент не существует убедительных доказательств того, что БА может развиваться вследствие вирусной инфекции, так как результаты исследований противоречивы из-за отсутствия контрольных образцов, методологических ограничений и неоднозначной интерпретации данных [1, 33, 213]. Хотя вирусная инфекция может ухудшать течение БА и увеличивать риск неблагоприятных исходов, интересным фактом является то, что у взрослых, инфицированных этими вирусами, не развивается БА [1, 54, 55, 108, 117].

В Австралии был обнаружен растительный изофлавоноид билиатрезон, который является одним из возможных экзогенных токсинов, способных вызвать атрезию желчных путей у животных. Этот изофлавоноид содержится в растениях,

которые употребляются скотом в условиях засухи [103]. Растительный изофлавоноид билиатрезон вызывает разрушение внепеченочных, но не внутрипеченочных желчных протоков у личинок рыбы *Danio rerio* (Zebrafish), которые являются классическим модельным объектом для биологических исследований [88]. Несмотря на то, что человек не подвергается воздействию билиатрезона, распознавание ключевых механизмов повреждения желчных протоков может привести к раскрытию токсинов, имеющих отношение к развитию билиарной атрезии у детей [1].

В настоящее время появляется все больше доказательств о генетической предрасположенности пациентов к развитию и особенностям течения билиарной атрезии. Наследование БА не происходит в соответствии с классическими законами Менделя. Несмотря на то, что были описаны отдельные случаи наследования БА, основная причина заболевания не связана с генетическими факторами [140]. Высокая заболеваемость БА в ряде регионов Азии наводит на мысль о большем распространении в этих популяциях генетических вариантов, ассоциированных с БА, однако не стоит исключать и особенности внешней среды (питание, вирусную нагрузку и др.) и отличия в диагностических критериях, используемых азиатскими специалистами [1, 86]. При изучении генетических факторов следует обратить внимание на исследования, проведенные с участием близнецов. В 2020 году проведен метаанализ клинических случаев по всему миру, связанных с рождением близнецов, один из которых имел БА. Из 35 пар, включая 19 моно- и 15 дизиготных пар, а также одну неизвестную пару, только одна пара была конкордантна по БА (дизиготная), тогда как остальные пары были дискордантными, где БА была диагностирована только у одного из близнецов (97,1%) [216]. Китайские исследователи в ретроспективном наблюдении также сообщили о 19 парах близнецов, все они дискордантны по БА, включая 8 монозиготных и 11 дизиготных пар [36].

Если монозиготные близнецы имеют одинаковый генотип, то появление дискордантности у них при наличии наследственной предрасположенности говорит о том, что генетические факторы не играют доминирующей роли в

развитии заболевания. С другой стороны, если заболевание вызывается инфекционным или токсическим агентом, то предполагается, что он должен был бы поразить обоих близнецов в утробе матери, что привело бы к одинаковому развитию заболевания, что не наблюдается в случае дискордантности у близнецов [1]. При рассмотрении случаев токсических или инфекционных эмбриопатий среди близнецов, особенно монозиготных, наблюдается конкордантность около 80% случаев, что означает, что в большинстве случаев оба близнеца поражаются заболеванием одновременно, указывая на значительную роль наследственных факторов в развитии таких заболеваний [1, 75]. Известно, что помимо изменений в генной последовательности, на фенотип могут влиять также эпигенетические модификации, которые имеют неклассический тип наследования. Например, монозиготные близнецы с БА могут иметь различия в фенотипе, несмотря на идентичность генотипа, что говорит о возможном влиянии эпигенетических факторов на развитие БА [216].

При изучении генетических механизмов в развитии БА проводится анализ генов-кандидатов, исследование числа копий генов (CNV, copy number variation), полногеномный поиск ассоциаций (GWAS, genome-wide association studies), секвенирование экзома (WES, whole exome sequencing) [1]. При GWAS оценивают связь между заболеванием и распространенными генетическими вариантами в разных популяциях исследуемой группы пациентов и в контрольной здоровой [1].

В рамках GWAS была обнаружена гетерозиготная делеция на участке 2q37.3 хромосомы у двух из 35 случаев БА, что отличается от контрольной группы, состоящей из 2026 здоровых людей [84]. У обоих пациентов была обнаружена делетированная область, которая составляла 1,76 млн п.о. и включала в себя 30 генов. Среди этих генов был выделен ген *AGXT*, экспрессирующийся в печени и кодирующий аланинглиоксилатаминотрансферазу (AGXT) – фермент, который участвует в метаболизме токсических веществ и расщеплении жиров [1]. Предполагается, что снижение активности AGXT может быть связано с токсическим повреждением билиарного тракта и играть важную роль в патогенезе БА. В исследовании описываются два пациента с делецией 2q37.3. В одном из

случаев женщина в период беременности работала в компании по клинингу и часто контактировала с химическими моющими средствами, которые могут иметь потенциально токсичное воздействие [1]. Во втором случае женщина заболела ветряной оспой на 15-й неделе беременности и лечилась ацикловиром, который может проникать через плацентарный барьер и метаболизироваться в клетках печени [1]. Несмотря на то, что отец одного из пациентов также являлся носителем делеции 2q37.3, у него не было заболеваний печени. Таким образом, наличие гетерозиготной делеции 2q37.3 может играть роль предрасполагающего фактора в развитии БА, возможно, за счет влияния на биотрансформацию ксенобиотиков. В другом исследовании те же авторы увеличили выборку до 61 пациента с БА против 5088 здоровых человек группы контроля [1, 71]. У шести пациентов (9,84%) и четырех здоровых людей (0,08%) были найдены делеции различной протяженности на участке 2q37.3. Однако в этот раз ассоциированный с делецией регион содержал только один ген *GPC1*, который кодирует глипикан – белок, снижающий активность Hedgehog-сигналинга и участвующий в реакциях воспаления [1]. Отсутствие гена *GPC1* у рыбок *Danio rerio* вызывает сверхактивацию Hedgehog-сигналинга, что приводит к нарушениям в формировании билиарного тракта, уменьшению размеров желчного пузыря и проблемам с экскрецией желчи из печени. У пациентов с билиарным атрезией наблюдается снижение уровня экспрессии *GPC1* в холангиоцитах. Исследователи предполагают, что ген *GPC1*, возможно, является геном, который повышает восприимчивость человека к развитию БА [1]. В исследовании «случай–контроль» проведенном китайскими авторами, выявлена потенциальная связь между определенными гаплотипами гена *GPC1* и снижением риска развития БА на 50% у пациентов, имеющих следующие гаплотипы по гену *GPC1*: *Crs2292832-Crs3828336&Trs3828336* или *Trs2292832-Trs3828336* [1, 49].

В первом GWAS на китайской популяции был выполнен анализ 500 000 однонуклеотидных повторов (ОНП) у 200 пациентов с БА и у контрольной группы, состоящей из 481 здоровых индивидов [83]. В результате анализа была обнаружена наиболее существенная связь с *rs17095355*, который находится в области 10q24.2

между генами X-пролиламинопептидазы P (*XPNPEP1*) и аддуцина 3 (*ADD3*) [1]. Авторы исследования не смогли определить, как межгенный вариант *rs17095355* может влиять на восприимчивость к БА, но предположили, что он может влиять на регуляцию соседних генов. Ген *ADD3* кодирует белок аддуцин 3, который принадлежит к семейству мембранных скелетных белков [1]. Этот белок участвует в актин-спектриновых взаимодействиях в эритроцитах и межклеточных контактах эпителиальных тканей, таких как ткани органов желудочно-кишечного тракта, печени и билиарного тракта [1, 73, 192]. У плода, по сравнению с взрослым человеком, экспрессия гена *ADD3* наиболее выражена в эпителиальных клетках печени и желчных протоках [1, 192]. Канальцевые мембраны желчных протоков сокращаются при взаимодействии актин-миозина, что способствует оттоку желчи. Однако, стоит отметить, что нарушение этого взаимодействия в экспериментах с применением лекарственных препаратов приводит к тяжелому холестазу [1, 150]. У пациентов с БА, у которых происходит нарушение оттока желчи после операции, наблюдается повышенное отложение актина и миозина вокруг желчных канальцев [19]. Более высокая экспрессия α -гладкомышечного актина связана с более выраженной степенью фиброза у пациентов с БА [151].

Ген *XPNPEP1* кодирует растворимую X-пролиламинопептидазу P (*APRP1*) или растворимую аминопептидазу P (*APP1*), которая экспрессируется в эпителиальных клетках гепатобилиарной системы [105]

Фермент *APRP1* участвует в процессе расщепления брадикинина (BK) и субстанции P (SP) [53]. Брадикинин принимает участие в процессах вазодилатации и увеличения проницаемости капилляров. Экспрессия брадикинина напрямую регулируется нуклеарным рецептором желчных кислот FXR (фарнезоид-X-рецептор), который играет важную роль в регуляции метаболизма и секреции желчных кислот, а также в процессах воспаления [1, 101, 181]. Медиатор воспаления SP участвует в регуляции секреции желчи, динамике желчевыводящих путей и иннервации печени. Роль гепатобилиарных переносчиков, включая FXR, была исследована на мышинных моделях [1, 110].

Исследование вызвало повышенный интерес к локусу 10q24.2, и было выполнено несколько работ с целью его изучения в различных популяциях [29, 31, 50, 119, 173, 197,]. Статистически значимая ассоциация между полиморфизмом *rs17095355* и БА была обнаружена не только в китайской популяции, но также в тайской когорте [31].

Хотя в работе, проведенной на группе североамериканских пациентов, не было обнаружено связи между *rs17095355* и БА, но была отмечена ассоциация БА с другим ОНП, *rs7099604*, который находится в первом интроне гена *ADD3* [1, 173]. При использовании количественной ПЦР были обнаружены различия в дифференциальной экспрессии гена *ADD3*, но не *XPNPEP1*, в тканях печени у больных и здоровых пациентов [1]. В то же время, никаких отличий в нуклеотидной последовательности гена *ADD3* между группами не было обнаружено [1]. Следовательно, возможно, что у больных пациентов могут существовать различия в регуляторных некодирующих участках ДНК или эпигенетические изменения [1].

В 2020 году было повторно продемонстрировано, что три ОНП в гене *ADD3* (*rs17095355*, *rs10509906* и *rs2501577*) и два ОНП в гене *GPC1* (*rs6750380* и *rs6707262*) связаны с БА у пациентов из Китая ($n = 340$) [1, 30]

Первая модель БА, созданная с использованием индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК), была разработана в 2019 году [1, 39].

Были получены индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) из образцов крови пациентов с билиарной атрезией, которые затем вновь дифференцировались в патологически измененные холангиоциты с признаками фиброза *in vitro* [1]. С помощью технологии CRISPR/Cas9 были внесены определенные генетические изменения в гены *GPC1* и *ADD3*, которые связаны с БА, в нормальную линию иПСК после чего проведена дифференциация в холангиоциты. Полученные таким образом клетки демонстрировали патологическое развитие холангиоцитов, аналогичное холангиоцитам, полученным из иПСК пациентов с билиарной атрезией. Использование модели БА на индуцированных плюрипотентных стволовых клетках представляет значительный потенциал для дальнейшего изучения механизмов развития болезни [1].

В 2015 году была обнаружена связь между риском развития билиарной атрезии и двумя ОНП (*rs3126184* и *rs10140366*), расположенными в гене *ARF* (аденозиндифосфатрибозилирующий фактор) на локусе 14q21.3 [1, 199]. Минорные аллели этих полиморфизмов связаны со снижением экспрессии *ARF6* [1]. Функции генов *ARF6*, *GPC1* и *ADD3* включают участие в формировании и развитии билиарного тракта. Кроме того, *GPC1* и *ARF6* играют роль в сигнальном пути фактора роста фибробластов (*FGF*) и эпидермального фактора роста (*EGF*), которые важны для органогенеза. *ARF6*, подобно гену *ADD3*, участвует в изменении актинового цитоскелета, регулирует подвижность клеток и межклеточные контакты. Активация *ARF6* происходит при связывании его с рецептором EGF (*EGFR*) и активатором *GEP100*, который запускает последующие реакции. Когда *EGFR-GEP100-ARF6* активируются, запускается каскад реакций, который включает в себя активацию белков ERK/MAPK и CREB. Эти процессы в итоге влияют на нормальное развитие и деление клеток [45, 85, 158, 193].

В настоящее время нет единой точки зрения, являются ли изменения во внутрипеченочных желчных протоках вторичными или формируются независимо [1]. У четырех детей с ранним постнатальным диагнозом БА в первые дни жизни была выполнена биопсия печени, которая продемонстрировала недостаточность внутрипеченочных желчных протоков без признаков фиброза и цирроза печени, что обычно обнаруживается при проведении ПЭ по Касаи или трансплантации печени [1, 32]. В 1974 году Landing В.Н. предположил, что при обструктивных холангиопатиях все билиарное дерево подвержено патологическому процессу. Вовлечение внутрипеченочных или внепеченочных протоков зависит от характера и продолжительности повреждающего воздействия [1, 118].

При подавлении функции гена *arf6* у личинок рыбы *Danio rerio* наблюдалось уменьшение размеров печени и числа билиарных эпителиальных клеток, нарушение секреции желчи и нарушение развития как внутрипеченочных, так и внепеченочных желчных протоков [1]. Аналогичные эффекты возникали при применении ингибитора *EGFR*. Авторы исследования отмечают, что сигнальный

путь *EGFR-Arf6* может участвовать в регуляции морфогенеза внутрипеченочных желчных протоков [1, 199].

Из 29 биоптатов печени пациентов с БА в двух обнаружили слабое иммуноокрашивание на *ARF6*, а также отметили снижение количества внутрипеченочных желчных протоков с признаками фиброза [1]. Исходя из этих результатов, авторы предположили, что снижение экспрессии *ARF6* может приводить к нарушению формирования не только внепеченочных, но и внутрипеченочных желчных протоков [1, 199].

Установлено, что участок 2p.16.1 является новым локусом восприимчивости к БА как в случае изолированной формы БА, так и в случае ее сочетания с другими аномалиями, основываясь на проведенном исследовании [1, 13]. Три ОНП, связанных с БА – *rs10865291*, *rs6761893* и *rs727878* были обнаружены в пятом интроне гена *EFEMP1*, расположенного в вышеупомянутом локусе. Выявлено, что у пациентов с холестатическими заболеваниями, включая БА, количество транскриптов *EFEMP1* в тканях печени (особенно в холангиоцитах и портальных фибробластах) было выше, чем у контрольной группы [1]. Функция гена *EFEMP1* заключается в кодировании белка фибулина-3, который играет важную роль в процессах ремоделирования экстрацеллюлярного матрикса, регенерации тканей и органогенезе [1, 79, 212]. *EFEMP1* участвует в активации сигнального пути Notch *in vitro*, но с меньшей эффективностью, чем *JAG1* [1, 78]. Связь между фибулинами и ламининами, а также другими экстрацеллюлярными протеинами, изучена. Кроме того, развивающиеся желчные протоки находятся в непосредственной близости и тесном взаимодействии с экстрацеллюлярным матриксом портальной мезенхимальной ткани [1]. С учетом этого, можно предположить, что белок *EFEMP1*, кодируемый геном *EFEMP1*, играет важную роль в развитии билиарного тракта [1]. В 2020 году исследование группы пациентов с БА из Китая не выявило связи между генами *EFEMP1* и *ARF6* и возникновением БА [1, 30].

В 2020 году в 30 семьях, где у детей диагностировали БА, при использовании трио-анализа экзома были найдены 66 различных вариантов *de novo* в 66 генах. Среди этих вариантов авторы выделили потенциально патогенные в генах *STIP1* и

REVI [6, 72]. Гены *STIP1* и *REVI* кодируют белки, которые взаимодействуют с белком теплового шока HSP90 и принимают участие в механизмах ответа на стресс [1]. Другие исследователи использовали технологию CRISPR/Cas9 для введения мутаций в гены *stip1* и *rev1* у рыбок *Danio rerio* и затем подвергли их воздействию билиатрезона [1]. В результате эксперимента мутантные рыбки оказались более чувствительны к низким дозам билиатрезона, в отличие от рыбок дикого типа [1, 107]. Исследования, проведенные на холангиоцитах *in vitro*, показали, что нокдаун генов *STIP1* и *REVI*, а также воздействие на них билиатрезона, вызывают нарушения цитоскелета. Полученные результаты подтверждают гипотезу о том, что окружающая среда может влиять на развитие БА у людей, генетически предрасположенных к этому заболеванию [1].

В 2020 году было выполнено трио-исследование экзома (WES) у детей в 89 семьях с диагнозом билиарная атрезия [104]. Выявлено, что у 31,5% пациентов имеются редкие патогенные *de novo* варианты в генах ресничек холангиоцитов [1]. Среди данных генов выделены три гена кандидата: *KIF3B*, *PCNT* и *TTC17* [1]. У пациентов с мутациями в генах *KIF3B* и *TTC17* было отмечено уменьшение количества белков *KIF3B* и *TTC17* в тканях печени [1]. Использование системы редактирования генов CRISPR/Cas9 и нокдауна генов *kif3b*, *pcnt* и *ttc17* у личинок *Danio rerio* привело к нарушению процесса оттока желчи у этих рыбок [1]. Согласно гипотезе авторов, дефектные реснички могут приводить к гиперактивации Нн-сигналинга либо аномальные холангиоциты могут повреждать желчевыводящие пути, что также вызывает усиление Нн-сигналинга и приводит к развитию воспаления и фиброгенезу [104].

Несмотря на проведенные исследования в области генетики, причины возникновения БА до сих пор остаются недостаточно изученными. Наблюдаемые изменения в генетическом материале, включая как наследственные, так и соматические мутации, не позволяют полностью объяснить развитие данного заболевания. Однако, предполагается, что возникновение БА связано с мультифакторными причинами, включая как генетические, так и эпигенетические механизмы, а также факторы окружающей среды, такие как вирусы и токсины.

Еще одним клинически важным аспектом заболевания является различная эффективность проводимого лечения у пациентов с БА. Проводятся многочисленные исследования как с изучением клинико-лабораторных, инструментальных данных, так и с изучением молекулярно-генетических маркеров, определяющих эффективность лечения при данной нозологии. Однако полученные результаты исследований противоречивы и не позволяют получить единую концепцию по предикторам исхода ПЭ. Своевременное выявление предикторов исхода операции позволит оптимизировать тактику ведения и повысит эффективность лечения детей с билиарной атрезией.

1.2 Проявления билиарной атрезии у новорожденных и детей первых месяцев жизни

Классическими проявлениями БА являются желтуха, ахолия стула и темная моча у новорожденных, которые родились в срок и имеют соответствующие гестационному возрасту антропометрические показатели [4, 217]. Как правило, у пациентов с БА на ранних этапах не имеется гепатоспленомегалии, но она может появиться при прогрессировании заболевания и развитии портальной гипертензии (ПГ) [131].

У новорожденных с БА желтуха возникает на 2–3-й день жизни, затем интенсивность ее уменьшается и к концу 1–2-й недели жизни отмечается ее нарастание. Около 60% доношенных и 80% недоношенных детей на 1-й неделе жизни имеют синдром желтухи. Тем самым данное проявление заболевания воспринимается за физиологическую желтуху, либо желтуху, обусловленную грудным вскармливанием [142]. Как правило, ахолия стула является типичным проявлением БА, однако его появление не всегда наблюдается сразу после рождения и чаще отмечается после отхождения мекония, то есть, когда ребенок уже выписан из родильного дома. И данное обстоятельство затрудняет правильную оценку стула неонатологом, а родители не всегда способны правильно определить нормальный цвет стула новорожденного [4, 144]. Во многих странах уже внедрены

программы скрининга, основанные на использовании карты стула новорожденного [4]. Они предназначены, прежде всего, для родителей, чтобы помочь им адекватно интерпретировать цвет стула и своевременно обратиться за медицинской помощью, если необходимо [4, 42, 89, 98, 169]. Данные карты включают набор цветов в норме и при патологии [4]. Установлено, что внедрение скрининговых программ с использованием карты стула новорожденного позволило увеличить процент ранней диагностики [40, 109]. Однако, несмотря на все усилия, проблема поздней диагностики остается актуальной во всем мире.

Одним из наиболее опасных проявлений БА является витамин-К-дефицитная коагулопатия. Более того, геморрагический синдром, в том числе и внутричерепные кровоизлияния, порой являются первым клинически выявленным симптомом заболевания, с которым ребенок может быть направлен на обследование. Данное осложнение является не только жизнеугрожающим при возникновении, но и оказывает влияние на здоровье ребенка даже после проведения ТП [51]. Механизм развития геморрагического синдрома связан с отсутствием поступления желчи в просвет кишечника при холестатических заболеваниях печени. Известно, что всасывание жирорастворимых витаминов, в том числе и витамина К, происходит при наличии желчи. Витамин К, в свою очередь, принимает участие в синтезе II, VII, IX и X факторов свертывания крови в печени.

Среди лабораторных маркеров к наиболее ранним и специфическим симптомам холестатических заболеваний печени, в том числе и БА, относят повышение прямой фракции билирубина (ПБ), в то время как другие биохимические маркеры холестаза, такие как: γ -глутамилтранспептидаза (ГГТ), щелочная фосфатаза (ЩФ), холестерин (ХС), желчные кислоты (ЖК) и трансаминазы: аланин аминотрансфераза (АЛТ), аспартат аминотрансфераза (АСТ), у детей первого месяца жизни могут быть в пределах возрастной нормы [4, 76, 58, 179]. Показатели белково-синтетической функции печени: альбумин, фибриноген и др. остаются неизменными в течение первых месяцев жизни до формирования печеночной недостаточности. В настоящее время скрининговые

программы, нацеленные на выявление заболевания в ранние сроки, основаны на измерении обеих фракций билирубина: общего и прямого, а также определения их соотношения. Традиционно при диагностике холестаза было принято исследовать соотношение прямого билирубина к общему, и на основании повышения данного показателя $> 20\%$, диагностируется холестатическое заболевание печени [143]. В последние годы проведены исследования, согласно которым холестатические заболевания печени, в том числе и БА, с высокой вероятностью может быть установлена в первые 2 недели после рождения при значениях прямого билирубина более 17,1 мкмоль/л [58].

Значительный интерес представляет изучение ультразвуковых признаков БА, так как ультразвуковое исследование (УЗИ) является высокоинформативным и широкодоступным методом визуальной диагностики. Основными ультразвуковыми маркерами БА являются изменения со стороны желчного пузыря (ЖП) в виде отсутствия визуализации, либо ЖП определяется в виде «гиперэхогенного тяжа», также отсутствует реакция со стороны ЖП на прием пищи и желчегонных препаратов. Один из наиболее характерных признаков БА – это симптом «треугольного рубца», который представляет собой гиперэхогенный тяж, расположенный над стволом воротной вены. [4, 120]. Ряд авторов выделяют в качестве УЗ признака БА расширение диаметра печеночной артерии [120, 208]. В неонатальный период, до формирования признаков ПГ, патологических изменений со стороны печени и селезенки в виде увеличения размеров и изменения эхоструктуры, как правило, не выявляется. Другие методы визуальной диагностики органов гепатобилиарной системы в виде магнитно-резонансной томографии и гепатобилиарной сцинтиграфии не нашли широкого применения, так как являются инвазивными, более того, чувствительность и специфичность данных исследований крайне низка [43, 160].

Дополнительное диагностическое значение имеет биопсия печени, при которой обнаруживают холестаз, пролиферацию желчных протоков, гигантоклеточную трансформацию гепатоцитов [194]. Наряду с этим биопсия печени позволяет оценить степень выраженности фиброза.

Подтверждение диагноза БА основано на морфологическом анализе биоптата печени и наружных желчных протоков, на обнаружении облитерации общего желчного протока [6].

Золотым стандартом лечения БА признана портоэнтеростомия (операция Касаи), которая была разработана в 1950-х гг. профессором Морио Касаи. Принцип хирургического вмешательства состоит в удалении облитерированных желчных протоков и создании анастомоза из двенадцатиперстной кишки, тем самым восстанавливается пассаж желчи по желчевыводящим путям. Однако эффективность операции широко варьирует, и факторы, определяющие исход хирургического вмешательства, до сих пор остаются недостаточно изученными. После проведения операции Касаи существует риск развития целого ряда осложнений в виде: бактериального холангита, расширения внутрипеченочных желчных протоков, ПГ и гепато-пульмонального синдрома и вследствие прогрессирования фиброза печени [124, 155].

1.3 Неинвазивные маркеры фиброза и цирроза печени у детей с билиарной атрезией

У 70% детей с БА после операции наблюдается прогрессирование фиброза печени (ФП), что может привести к развитию цирроза печени (ЦП), сопровождающегося портальной гипертензией (ПГ) и печеночной недостаточностью [28]. Основным показанием к проведению ТП у детей с БА являются осложнения, связанные с ЦП [126]. Биопсия печени является наиболее точным методом для оценки степени фиброза в печени [183, 203]. Данная процедура является инвазивной и связана с риском возникновения некоторых осложнений, таких как болевой синдром, кровотечение и гипотензия [44].

Для проведения биопсии печени требуется проведение общей анестезии, что ограничивает возможность повторных исследований, в связи с чем невозможно оценить прогрессирование или регресс фиброза печени в динамике [6, 70].

Некоторые исследования показали, что биопсия печени имеет недостатки, такие как неправильный выбор образца материала, вариабельность в интерпретации и оценке данных гистологического исследования [5, 6]. При обследовании взрослых пациентов с хроническими заболеваниями печени, такими как алкогольная болезнь печени, вирусный гепатит В и С, неалкогольная жировая болезнь печени, могут быть использованы неинвазивные методы для оценки степени ФП, согласно рекомендациям клинических руководств [6, 68, 127]. На данный момент не существует клинических руководств для использования неинвазивных тестов при оценке степени фиброза печени у детей с хроническими заболеваниями печени [6].

Для оценки степени фиброза печени у взрослых пациентов с хроническими заболеваниями печени широко используется индекс APRI (отношение активности аспаратаминотрансферазы к уровню тромбоцитов), который является доступным и неинвазивным методом диагностики [6, 167, 209]. Однако данные об использовании этого индекса у детей с хроническим вирусным гепатитом В, муковисцидозом и БА противоречивы [18, 125, 185]. В настоящее время проводятся активные исследования в области визуальной диагностики, включая применение доплеровского ультразвукового исследования, для оценки степени развития фиброза и цирроза при хронических заболеваниях печени [6]. Результаты исследований показывают, что ультразвуковые показатели, такие как спленомегалия, небольшое увеличение или уменьшение размера обеих долей печени, неровный контур, гиперэхогенность паренхимы с неоднородной структурой, сужение печеночных вен, расширение воротной и селезеночной вен, а также повышение индекса резистентности печеночных артерий, имеют высокую значимость в прогнозировании цирроза и портальной гипертензии у пациентов с хроническими заболеваниями печени [6, 146, 195]. Однако, исследования проводились с учетом взрослых и детей старшего возраста, что делает актуальным поиск неинвазивных маркеров фиброза и цирроза печени у детей раннего возраста, а в частности, у пациентов с билиарным атрезией.

1.4 Предикторы исхода операции Касаи у детей с билиарной атрезией

Эффективность операции Касаи оценивается: по появлению окрашенного стула, купированию желтухи и снижению уровня общего билирубина (ОБ) < 34 мкмоль/л в течение 3–6 месяцев после проведения операции, в долгосрочной перспективе оценивается выживаемость с нативной печенью [135]. Но по данным различных авторов эффективность операции колеблется от 36–61% в Европе [134, 206], а по данным Masaki Nio эффективность ПЭ в Японии составляет 87,2% [190].

Несмотря на многочисленные исследования, проведенные в последние десятилетия, до конца не изучены факторы, определяющие эффективность операции и выживаемость с нативной печенью [20, 86, 129]. На сегодняшний день различными авторами выделяются факторы, среди которых можно отметить модифицируемые, такие как: возраст на момент проведения ПЭ [163], опыт хирурга [16], использование стероидной терапии в послеоперационном периоде [65], а также немодифицируемые факторы: тип билиарной атрезии, наличие сочетанных аномалий развития, уровень биохимических маркеров, изменения в ткани печени, выявляемые при гистологическом исследовании биоптата: степень выраженности фиброза печени, воспалительных изменений, диаметр желчных протоков [41, 164, 165, 191].

Индивидуальные генетические характеристики каждого пациента могут существенно влиять на клиническую тяжесть заболевания, однако, несмотря на фенотипическую гетерогенность БА, сравнительно мало исследований направлено на изучение генетических факторов, влияющих на результаты хирургического лечения – портоэнтеростомии Касаи [1]. Некоторые исследователи указывают на то, что гены, такие как *AIAT*, *JAG1* и *CFTR*, могут влиять на исход операции [71, 139, 157, 176, 218]

Дефицит альфа-1-антитрипсина приводит к моногенному аутосомно-рецессивному заболеванию (генотип ZZ по гену *AIAT*), вызывающему патологию

печени у детей [1]. Установлено, что патологические аллели *Z*, *S* и другие (в гетерозиготном состоянии) чаще встречаются у детей с хроническими заболеваниями печени ($n = 241$), включая БА ($n = 67$), по сравнению с общей популяцией [1, 96]. При этом у детей с БА и такими генотипами потребовалось проведение трансплантации печени раньше, чем у детей с БА и нормальным генотипом *MM* [1].

В Таиланде был выполнен WES-анализ ДНК, выделенной из печени при биопсии у 20 пациентов с БА после портоэнтеростомии [1, 211]. У семи из них после операции купировалась желтуха, у трех отмечено частичное улучшение, а у 10 не было эффекта от проведенной ПЭ. У пациентов с БА обнаружены 13 редких вариантов в 9 генах, связанных с известными заболеваниями, включая холестатические (но клинические симптомы не выявлены): *JAG1* (синдром Алажилль, AGS); *MYO5B* (врожденная атрофия микроворсинок/прогрессирующий семейный холестаза тип 6); *ABCB11* (семейный внутрипеченочный холестаза тип 2); *ABCC2* (синдром Дубина – Джонса); *ERCC4* (анемия Фанкони); *KCNH1* (синдром Циммермана – Лабанда); *MLL2* (синдром Кабуки); *RFX6* (синдром Митчелла – Рея) и *UGT1A1* (синдром Криглера – Найяра тип I) [1]. Исследователи предполагают, что БА и другие печеночные заболевания могут иметь схожий этиопатогенез. Наличие таких ассоциаций указывает на тяжесть состояния и неблагоприятный прогноз для пациентов с БА с нативной печенью [1].

У девяти из 102 пациентов с БА обнаружена миссенс-мутация в гене *JAG1*, однако типичные проявления синдрома Алажилль не выявлены [201]. Авторы отмечают, что у детей с таким вариантом прогноз и результат ПЭ хуже. Тем не менее, недавние исследования показали, что синдром Алажилль (AGS) может иметь клинические симптомы БА: у пяти детей с диагностированной в младенчестве БА и патогенными вариантами в гене *JAG1* к трехгодичному возрасту развился характерный симптомокомплекс AGS [1, 22].

В течение последнего десятилетия было получено множество данных, связанных с компенсаторными способностями печени при холестазах, что обусловлено регулированием активности гепатоцитарных транспортеров (*BSEP*,

MDR1, *MDR3*, *OSTb*) и ядерных рецепторов желчных кислот (*FXR*, *PXR*, *CAR*) [1, 52, 74, 123]. Печень хорошо адаптируется к накоплению желчных кислот [1]. У здоровых детей генетически определяемый дефицит указанных рецепторов не проявляется клинически из-за существующих компенсаторных механизмов [1]. Впрочем, при холестатических заболеваниях, включая БА, такие изменения могут стать дополнительным фактором, влияющим на развитие патологии [1]. При нормальной работе гепатоцитарных транспортеров гепатоциты защищены от токсического воздействия ЖК за счет их выведения через *BSEP*-транспортер, в то время как билиарный эпителий защищен ключевыми транспортерами *FIC1* и *MDR3* [1, 112]. С учётом полученной информации, на данный момент были проведены исследования, направленные на оценку уровня экспрессии нуклеарных факторов печени и гепатоцеллюлярных транспортеров в качестве предикторов ПЭ у детей с БА [1].

Выявлено, что в группе пациентов с неблагоприятным результатом ПЭ, экспрессия генов рецепторов *PXR* и/или *CAR* в тканях печени значительно ниже по сравнению с пациентами с благоприятным исходом [1]. Из шести пациентов со сниженной экспрессией обоих генов, у пятерых потребовалась трансплантация печени в возрасте до 1 года (7–11 месяцев) [74]. Ранее было также продемонстрировано, что у крыс, нокаутных по *PXR*, повреждение печени из-за накопления ЖК было существенно выше, чем у контрольных [1, 148, 177]. Предполагается, что низкий уровень *CAR* и *PXR* у пациентов может быть связан как с генетическими факторами, так и с воспалительными процессами [1]. Определено, что данные ядерные рецепторы ЖК участвуют в регулировании гомеостаза желчи, связываясь с ЖК, транспортируются в ядро, снижая экспрессию генов ферментов, синтезирующих и реабсорбирующих ЖК, но при этом усиливают экспрессию генов, кодирующих транспортеры *BSEP*, *MRP4* и *OST α -OST β* , удаляющих ЖК из гепатоцита [1, 46, 52, 92, 114, 123, 133].

WES-анализ был выполнен с целью определения генетических вариантов, которые встречаются чаще у пациентов с БА, нуждающихся в ранней трансплантации печени из-за неэффективности КРЕ, по сравнению с детьми, у

которых функционирует нативная печень [1, 137]. Среди 98 детей, требовавших раннюю трансплантацию печени, несинонимичный вариант *p.A934T* в гене *ABCB4* выявлялся чаще, чем в группе детей ($n = 97$) с нативной печенью после портоэнтеростомии [1]. Снижение экспрессии *ABCB4*, кодирующего *MDR3*, приводит к сокращению фосфолипидов в желчи, что может вызывать повреждение холангиоцитов из-за ЖК [1].

В 2020 году в ходе полнотранскриптомного секвенирования мРНК 25 образцов печени пациентов с БА [174], анализ дифференциальной экспрессии выявил потенциальные маркеры исхода ПЭ: матричная металлопротеиназа 7 (*MMP7*) и фосфоенолпируваткарбоксикиназа (*PCK1*). *MMP7* фермент, который участвует в ремоделировании внеклеточного матрикса во время фиброза печени, а *PCK1* играет роль в глюконеогенезе, хотя его функция в развитии БА менее изучена [1]. Экспрессия *MMP7* значительно повышалась у пациентов с некупирующейся желтухой после КРЕ и у пациентов с терминальной стадией заболевания печени [1]. В то время как уровень экспрессии *PCK1* был выше у пациентов с благоприятным исходом КРЕ, у пациентов с неблагоприятным прогнозом КРЕ наблюдалось существенное снижение его содержания [1].

Таким образом, модели экспрессии разных генов в тканях печени и желчевыводящих путях могут потенциально служить биомаркерами для прогноза исхода КРЕ, что даст возможность разработки новых методов лечения БА [1].

Основу патогенеза БА могут составлять эпигенетические изменения (такие как метилирование ДНК, модификации гистонов, экспрессия некодирующих РНК и прочее) [1]. Уровень метилирования ДНК существенно снижался в клетках желчных протоков у пациентов с БА по сравнению с больными другими холестатическими заболеваниями печени [1, 60]. Это могло способствовать активации *IFN γ* -сигналинга и развитию воспаления [1]. Ранее были также обнаружены разнообразные эпигенетические модификации в периферических лейкоцитах (например, CD4⁺ T) у некоторых пациентов с БА [1, 17, 59, 81, 87].

Установлено, что гипометилированный ген фактора роста тромбоцитов *A, PDGFA*, гиперэкспрессируется в биоптатах печени пациентов, вероятно, играя роль

в патогенезе БА [1, 136]. Белки семейства *PDGF* стимулируют пролиферативные и фибротические процессы в различных органах. Таким образом, вариант *rs9690350* (*G > C*) в *PDGFA* ассоциирован с повышенным риском БА у 506 пациентов против 1473 здоровых [154].

Экспрессия некоторых микроРНК в печени у пациентов с БА отличается от уровней у здоровых людей. Например, *mir-29b* и *mir-142-5p* гиперэкспрессируются в печени при БА, и они направлены на гены ключевых ферментов *DNMT1* и *DNMT3*, участвующих в метилировании ДНК [1, 138]. Другая микроРНК, *mir-145-5p*, нацелена на ген *ADD3*, и ее экспрессия снижена в печеночных тканях некоторых пациентов с БА [1, 62].

Гепатопортоэнтеростомия по Касаи – хирургическое лечение БА, предложенное в 1955 г., способствует сохранению функционального состояния печени и позволяет отсрочить проведение трансплантации печени у детей. На данный момент мало известно о факторах, влияющих на эффективность этой операции и выживаемость пациентов с нативной печенью [1]. Генетические характеристики каждого пациента и уровни экспрессии разных генов в тканях печени и желчных протоках рассматриваются в качестве прогностических биомаркеров [1], но необходимы дополнительные исследования для подтверждения.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы исследования

Исследование проведено в ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России. Ведение детей в до- и послеоперационном периоде осуществлялось в отделе педиатрии Института неонатологии и педиатрии (заведующая отделением – д. м. н., профессор А. В. Дегтярева), все дети были прооперированы в 4-м хирургическом отделении ГБУЗ ДГКБ им. Н.Ф. Филатова (заведующий отделением – д. м. н., профессор, член-корр. РАН А. Ю. Разумовский), генетические методы исследования осуществлялись в институте трансляционной медицины «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» (руководитель – д. б. н., профессор Д. В. Ребриков), в группе методов высокопроизводительного секвенирования (руководитель – к. б. н. Д. О. Коростин) Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГАОУ ВО РНИМУ имени Н. И. Пирогова Минздрава РФ, лаборатории наследственных болезней обмена веществ ФГБНУ «МГНЦ им. Н. П. Бочкова» (заведующая лабораторией – д. м. н. Е. Ю. Захарова).

Критерии включения в исследование:

1) дети с подтвержденным диагнозом БА на основании изменений при гистологическом исследовании биоптата печени и наружных желчных протоков, при серийных срезах которых обнаруживали облитерацию общего желчного протока;

2) период наблюдения не менее 6 месяцев после проведенной операции;

3) информированное согласие родителей на включение в исследование.

Критериями исключения были:

1) дети с тяжелыми сочетанными пороками развития других органов, хромосомными патологиями, наследственными заболеваниями обмена веществ;

2) недостаточное количество данных для анализа;

3) период наблюдения < 6 месяцев после проведенной операции;

4) отсутствие подписанного информированного согласия.

Данное клиническое исследование было одобрено Комиссией по этике биомедицинских исследований (протоколом № 10 от 5 ноября 2020 года), утверждено в ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России на Ученом совете 9 февраля 2021 года (протоколом № 8).

Для решения первой задачи был проведен анализ медицинских историй болезней 178 детей с подтвержденным диагнозом БА, из которых 163 проведена операция Касаи, а 7 – трансплантация печени (Рисунок 1).

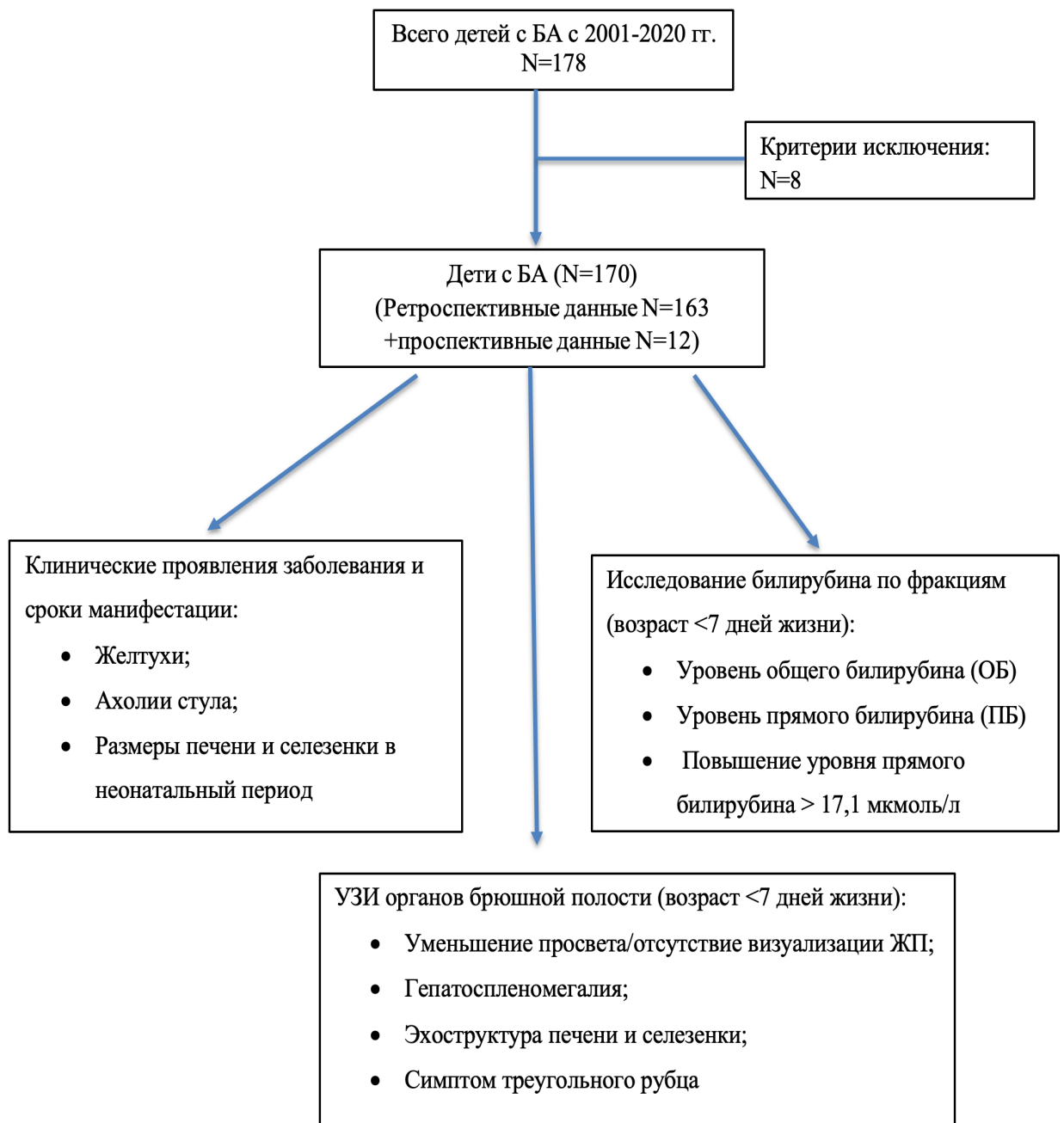


Рисунок 1 – Дизайн исследования к задаче 1

Всем детям операция Касаи выполнена одним хирургом (Разумовским А. Ю.) в ГБУЗ ДГКБ им. Н. Ф. Филатова. После хирургического вмешательства всем детям проводилась стандартная терапия, включающая: применение стероидов, урсодезоксихолевой кислоты и антибактериальных средств. 7 детям в НМИЦ трансплантологии и искусственных органов имени академика В. И. Шумакова была выполнена трансплантация печени без предварительной операции Касаи. Для всех детей был установлен возраст на момент проведения операции Касаи, а также проведена оценка частоты возникновения геморрагического синдрома. В дальнейшем были исследованы клинические симптомы заболевания (желтуха, размеры печени и селезенки, цвет стула), сроки их проявления, а также результаты лабораторных исследований (общий и прямой билирубин, повышение уровня прямого билирубина более 17,1 мкмоль/л в первые 7 дней жизни) и результаты УЗИ органов брюшной полости в ранний неонатальный период.

Для решения 2-й задачи было осуществлено ретроспективное и проспективное исследование типа «случай – контроль» в промежутке времени с августа 2001 года до ноября 2022 года (Рисунок 2). В данное исследование было включено 132 ребенка после проведения операции Касаи. Проводилась оценка выживаемости детей с нативной печенью и описывалась частота развития осложнений в различные возрастные периоды после операции в группе пациентов с успешным исходом ПЭ.

Холангит определялся на основании следующих критериев: повышение температуры тела до фебрильных значений, увеличение маркеров системного воспалительного ответа (С-реактивный белок, прокальцитонин, СОЭ, изменения лейкоцитарной формулы) в комбинации с разными степенями выраженности клинических и лабораторных признаков холестаза, синдрома цитолиза и ухудшения синтетической функции печени [172].

Для выявления портальной гипертензии анализировались ультразвуковые и доплерографические данные: нарушение кровообращения в портальной системе, реканализация пупочной вены, асцит, увеличение размеров селезенки [172]. С

помощью эндоскопического исследования определялась степень варикозного расширения вен пищевода. Клинические и лабораторные проявления включали: развитие кровотечения из вен пищевода, наличие гиперспленизма в виде тромбоцитопении, анемии и лейкопении.

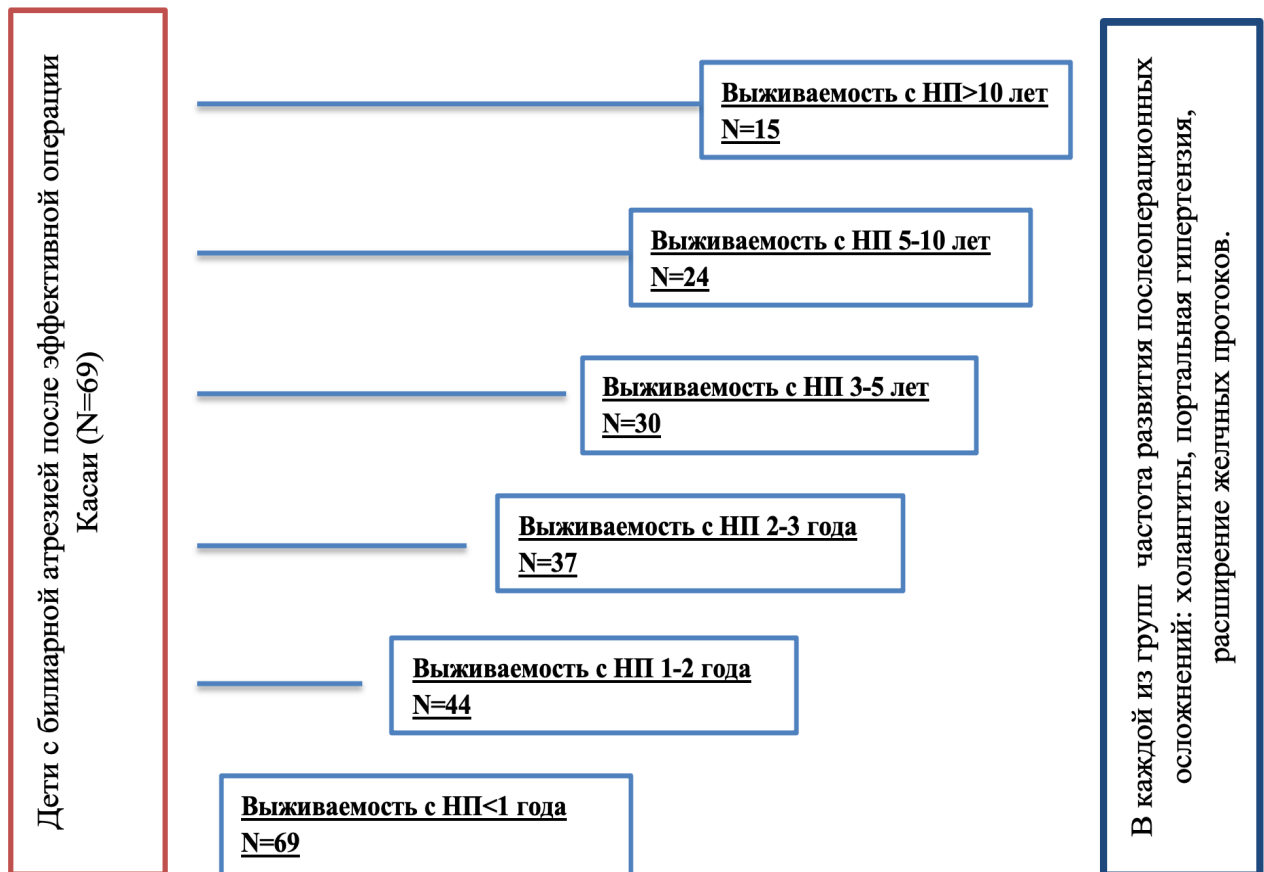


Рисунок 2 – Дизайн исследования к задаче 2

Расширение внутрипеченочных желчных протоков выявлялось по данным ультразвукового исследования печени.

Для решения третьей задачи был проведен сравнительный и корреляционный анализ данных 166 детей, которым была проведена операция Касаи с сентября 2002 г. по декабрь 2021 г. (Рисунок 3). Проводился сравнительный и корреляционный анализ между клинико-лабораторными, ультразвуковыми параметрами в предоперационном периоде и степенью выраженности фиброза при морфологическом исследовании биоптата печени. Биопсия печени всем детям проводилась интраоперационно. На основании степени фиброза печени, оцененной по шкале Десмет при гистологическом исследовании биоптата печени все дети

были разделены на две группы:

- 1) 1-я группа (N = 108) – отсутствие/умеренный фиброз (0–2 балла);
- 2) 2-я группа (N = 58) – выраженный фиброз/цирроз печени (3-4 балла) [6].

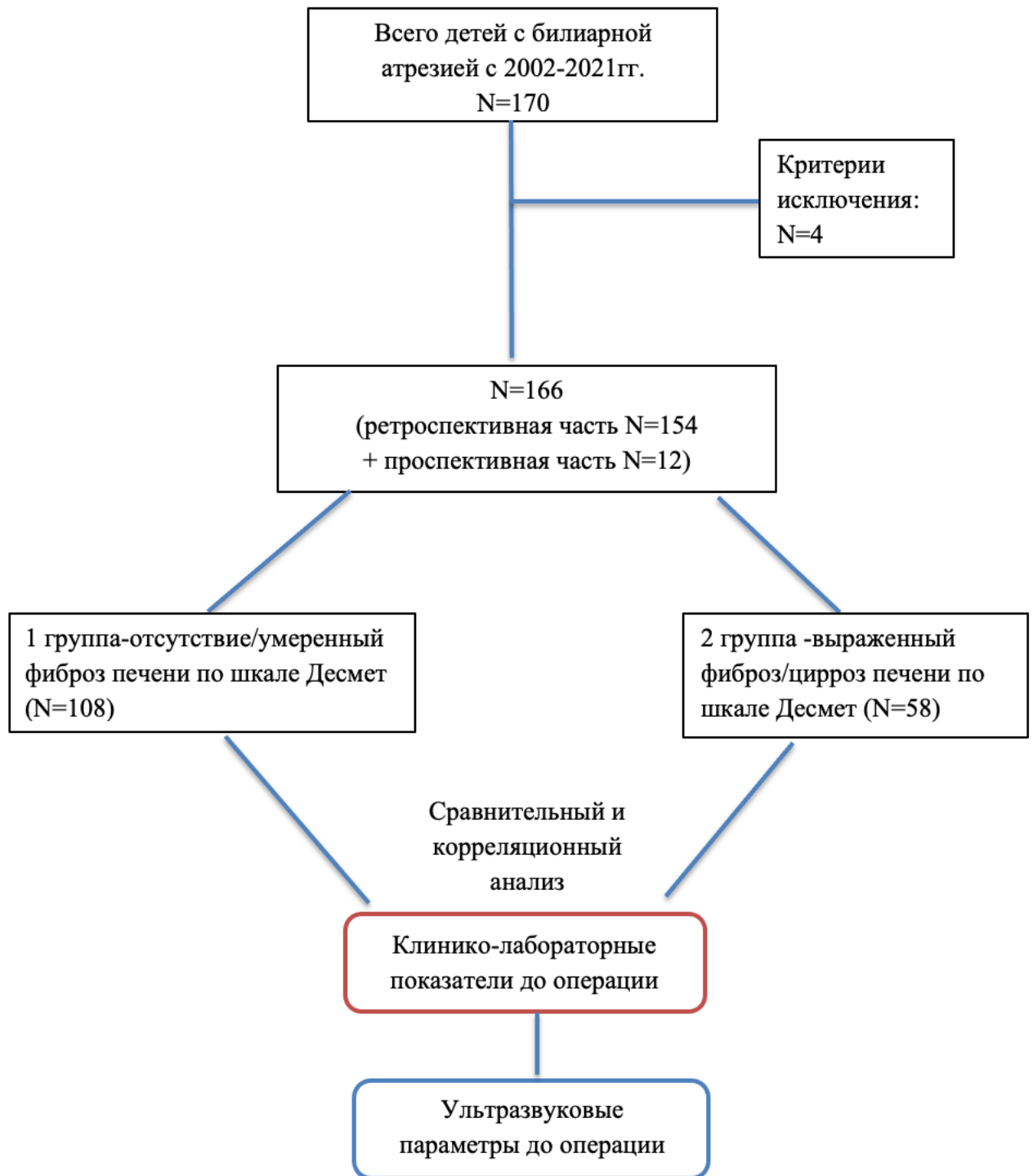


Рисунок 3 – Дизайн исследования к задаче 3

Для решения четвертой задачи проведено полноэкзомное секвенирование для 66 пациентов с билиарной атрезией. В качестве контрольной группы использовалась выборка из 637 ранее отсеквенированных по полному экзому образцов здоровых представителей российской популяции (Рисунок 4).

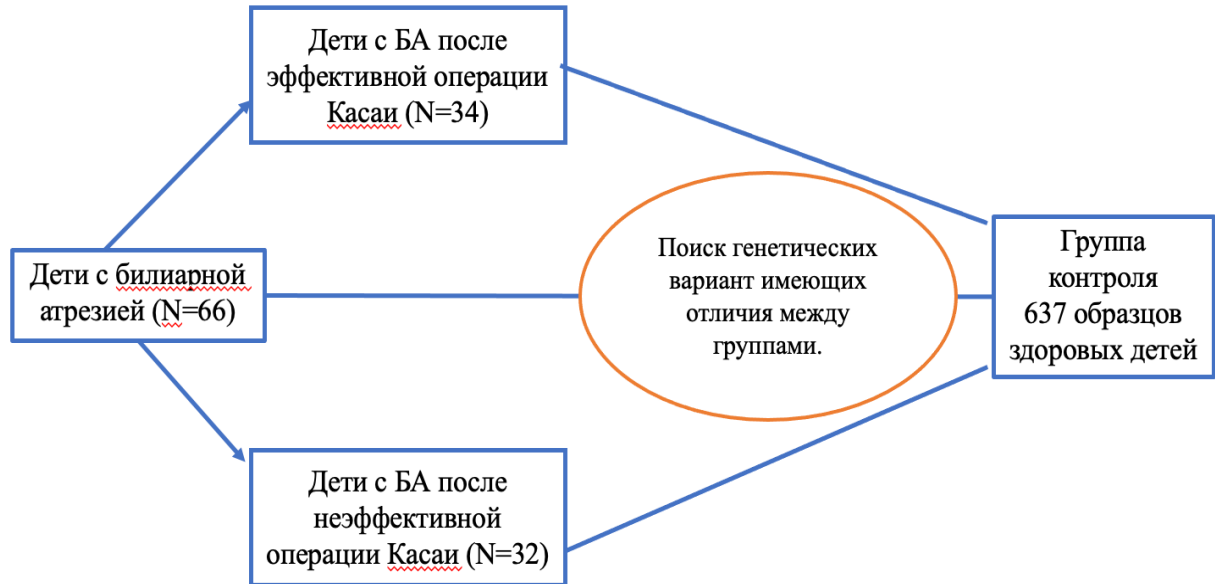


Рисунок 4 – Дизайн исследования к задаче 4

С целью анализа влияния молекулярно-генетических маркеров на исход операции Касаи выборка пациентов с диагнозом БА была разделена на две когорты («эффективная операция» и «неэффективная операция»), для каждой из которых, в свою очередь, были проведены EWAS с использованием 637 здоровых образцов, были построены аддитивная, доминантная и рецессивная модели наследования.

Для решения 5-й задачи проведено ретроспективное и проспективное исследование – случай – контроль в период с сентября 2002 по декабрь 2021 гг. (Рисунок 5). Все дети (N = 166) были разделены на две группы на основании эффективности операции Касаи.

1) 1-я группа (N = 69) – с эффективной операцией Касаи (появление окрашенного стула после операции, купирование желтухи, снижение уровня ОБ < 34,2 мкмоль/л в течение 3–6 месяцев после операции);

2) 2-я группа (N = 97) – с неэффективной операцией Касаи (ахолия стула, сохраняющаяся желтуха, показатель ОБ > 34,2 мкмоль/л)



Рисунок 5 – Дизайн исследования к задаче 5

2.2 Методы исследования

Метод клинико-anamнестического анализа, который включал изучение анамнеза детей: гестационный возраст, вес при рождении, сроки появления желтухи, ахолии стула, наличие геморрагического синдрома до установления диагноза, увеличение размеров печени и селезенки в неонатальный период, наличие сопутствующей патологии, возраст на момент проведения операции Касаи (дни жизни) [4], вес и рост на момент проведения операции, за 1–3 дня до операции и на 14 ± 3 сутки проводилось измерение размеров печени (по передней подмышечной линии, среднеключичной линии, см из-под края реберной дуги), селезенки (см из-под края реберной дуги), в послеоперационном периоде оценивалось появление окрашенного стула и сроки его появления.

2.2.1. Лабораторные методы исследования

В анализ лабораторных данных были включены клинические, биохимические, а также показатели коагулограммы. Данные исследования проводились за 1–3 дня до операции и на 14±3-и сутки после операции. В клиническом анализе крови подсчитывалось количество тромбоцитов ($\times 10^9/\text{л}$), в биохимическом анализе крови и коагулограмме: альбумин (г/л), холинэстераза (ХЭ) (Ед/л), ГГТ (Ед/л), ХС (ммоль/л), ЩФ (Ед/л), ОБ, (ммоль/л), ПБ (ммоль/л), АЛТ (Ед/л), АСТ (Ед/л), фибриноген (г/л), международное нормализованное отношение (МНО), тромбиновое время (ТВ) (сек), протромбиновый индекс (ПТИ) (%), также были рассчитаны индексы APRI, AAR (aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase ratio) [6].

Расчет индексов производится следующим образом:

$$AAR = \frac{АСТ}{АЛТ}; \quad (1)$$

$$APRI = \frac{АСТ/АСТ_{\text{верхняя граница нормы}}}{\text{Кол} - \text{во тромбоцитов (10}^9/\text{л)}} \times 100. \quad (2)$$

2.2.2. Инструментальные методы исследования

Ультразвуковые методы исследования – УЗИ органов брюшной полости. Всем исследуемым детям за 3–7 дней до операции проводилось комплексное ультразвуковое обследование на аппаратах Toshiba Aplio с использованием конвексного датчика с частотой 3,5 МГц, линейного датчика с частотой 8 МГц, на аппарате GE Voluson E8 конвексным датчиком с частотой 2–5 МГц, линейным с частотой 4–10 МГц. УЗИ выполнялось после голодной паузы не менее 4 часов. На первом этапе всем детям осуществляли стандартное исследование гепатобилиарной системы в В-режиме, оценивали размеры, форму, контуры печени, эхоструктуру и эхогенность, длину и ширину желчного пузыря (ЖП), размеры фиброзной площадки, строение и диаметр воротной вены, диаметр

печеночной артерии, индекс диаметр общей печеночной артерии/диаметр воротной вены ($D_{опа}/D_{вв}$), размеры селезенки. На втором этапе оценивали сосудистый рисунок печени в режиме цветового доплеровского картирования для исключения аномалий строения и порто-системного шунтирования. На третьем этапе исследовали доплерографические параметры с применением импульсно-волновой доплерометрии, оценивали скоростные и спектральные характеристики воротной вены, печеночной артерии.

Для анализа применялись следующие количественные показатели: длина и ширина желчного пузыря, размеры фиброзной площадки, передне-задний размер правой и левой долей печени, длина и ширина селезенки, индекс резистентности (ИР) печеночной артерии, скорость кровотока печеночной артерии, диаметр печеночной артерии, диаметр воротной вены и скорость кровотока по воротной вене. Вычислялся индекс: отношения диаметра общей печеночной артерии (ОПА) к диаметру воротной вены (ВВ) [6].

Изучались такие номинальные показатели как: наличие ЖП, однородность ткани печени, повышение эхогенности печени, наличие гепато- и спленомегалии, асцит, закругление края печени, наличие фиброзной площадки. Исследование всем детям проводилось 2 специалистами экспертного уровня с большим опытом работы в детской гепатологии.

Морфологическое исследование биоптата печени – всем детям интраоперационно проводилась биопсия печени с последующим гистологическим исследованием ткани печени. Исследования выполнялись с использованием как пункционных, так и краевых биопсий ткани печени по следующему алгоритму: материал фиксировался в 10%-м нейтральном формалине с фосфатным буфером (нейтральный забуференный формалин). При макроскопическом исследовании измерялся размер биоптата, цвет, оценивалось наличие прослоек соединительной ткани. Далее осуществляли гистологическую проводку в аппаратах и заливка в парафин. Изготавливались серийные срезы, толщиной 3–4 мкм, которые депарафинировались, регидратировались и окрашивались. Окрашивание проводилось: гематоксилином и эозином, трихромом по Массону или

пикрофуксином по Ван – Гизону (обе окраски на соединительную ткань), ШИК – реакция (PAS-реакция) в контроле с амилазой, на железо по Перлсу.

Для последующего иммуногистохимического исследования (ИГХ-исследования) срезы толщиной 3–4 мкм были размещены на предметные полилизиновые стекла. Исследование проводилось с моноклональными антителами СК 7 и СК 19 (цитокератин). Срезы окрашивали вручную. Препараты изучали на световом микроскопе Leica DM2000. Цифровые изображения гистологических срезов получали посредством сканирования на Pannoramic MIDI. Для оценки степени выраженности фиброза использовался **гистологический индекс склероза (ГИС) – Десмет:**

- портальный и перипортальный фиброз (слабый) – 1 балл;
- фиброз хотя бы с одной порто-портальной септой (умеренный) – 2 балла;
- порто-портальные септы и хотя бы одна порто-центральная септа (выраженный) – 3 балла;
- септы с формированием псевдолобулярных структур (цирроз – структурная перестройка) – 4 балла [6].

2.2.3. Молекулярно-генетические исследования

Геномная ДНК была выделена из периферической венозной крови пациентов с использованием коммерческого набора QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Германия) по протоколу производителя. Концентрации ДНК измеряли на флуориметре Qubit Flex (Life technologies, США) с набором dsDNA BR Assay Kit по протоколу производителя.

Приготовление библиотек коротких фрагментов ДНК осуществляли из 500 нг геномной ДНК, с использованием набора MGIEasy Universal DNA Library Prep Set (MGI Tech, Китай) по протоколу производителя. Этап фрагментации ДНК осуществляли ультразвуком на приборе Covaris S-220 со средней длиной фрагментов 250 п.н. Обогащение библиотек ДНК проводили с предварительным пулированием библиотек по методике [187]с использованием зондов SureSelect

Human All Exon v6 или v7 (Agilent Technologies, США), включающих в себя полный экзом человека. Концентрации готовых библиотек измеряли на флуориметре Qubit Flex (Life technologies, США) с набором dsDNA HS Assay Kit по протоколу производителя. Проверку качества библиотек производили на приборе Bioanalyzer 2100 с набором High Sensitivity DNA (Agilent Technologies, США) по протоколу производителя.

Прошедшие контроль качества образцы подвергались циркуляризации с последующей подготовкой «ДНК-наноболлов» по протоколу производителя MGI Tech. Высокопроизводительное парноконцевое (англ. pair-end) секвенирование нуклеотидных последовательностей проводили на приборе MGISEQ-2000 (MGI Tech, Китай) в режимах PE100 и PE150, используя комплект реактивов DNBSEQ-G400RS High-throughput Sequencing Set (MGI Tech, Китай). Файлы формата FastQ были сгенерированы с использованием программного обеспечения производителя basecallLite (MGI Tech, Китай).

2.2.4. Биоинформатическая обработка

Контроль качества полученных парных fastq-файлов проводился с помощью FastQC v0.11.9 (Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2017). На основании метрик качества fastq-файлы были обрезаны с помощью BBDuk по BBDuk (https://github.com/BioInfoTools/BBDuk). Полученные короткие прочтения выравнивались по индексированному референсному геному GRCh37 с помощью bwa-mem2 [122]. Файлы SAM были преобразованы в файлы BAM и отсортированы с помощью SAMtools v1.10 для проверки процента выровненных прочтений [200]. Анализ контроля качества проводился на помеченных BAM файлах со следующим целевым файлом Agilent all-exon v6 или v7 "regions.bed". Для образцов, прошедших контроль качества (доля целевых участков, покрытых более 10 раз $\geq 95\%$), был проведен коллинг однонуклеотидных вариантов и коротких инсерций и делеций (англ. indel) программой bcftools mpileup [121], получены VCF файлы для каждого образца. После коллинга вариантов VCF файлы были

нормализованы с помощью `vt normalize` [189] и отфильтрованы по целевым регионам, расширенным на ± 100 пар оснований с каждого конца. После этого проводили исследование методом полноэкзомного поиска ассоциаций.

2.2.5. Полноэкзомный поиск ассоциаций

Окончательная выборка составила 66 пациентов с билиарной атрезией и 637 контрольных здоровых (всего 352 245 уникальных полиморфных маркеров). С помощью программы PLINK v1.90b6.24 (<https://github.com/chrchang/plink-ng/tree/master/1.9>) был проведен контроль качества. Исключались маркеры, генотипированные менее чем у 80% образцов (1125 были удалены). В свою очередь, качество генотипирования каждого образца было выше 80%. Установление частоты минорного аллеля выше 0,1 оставило 34 078 вариантов. Тест на равновесие Харди – Вайнберга прошли 29 890 маркеров ($p < 0,0001$). Оценка ассоциации проводилась методом логистической регрессии с построением аддитивной, доминантной и рецессивной моделей (коварианта – первая главная компонента). Полученные p -значения были скорректированы при помощи поправки Бонферрони ($p_{adj} < 0,05$). Затем образцы пациентов были разделены на группы «эффективная операция» / «неэффективная операция» для сравнения с контрольными образцами и повторно построены аддитивная, доминантная и рецессивная модели для каждой из этих групп. Полученные p -значения были скорректированы при помощи поправки Бенджамини – Йекутиели ($p_{adj} < 0,05$).

2.2.6. Функциональный анализ обогащения

Полиморфные варианты аннотированы с помощью базы данных RefSeq (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>) и ресурса SNP-nexus (<https://www.snp-nexus.org/v4/>), а также указанными в базе данных dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). Один из них не имел rsID, но не был исключен из обработки данных. Для проведения функционального анализа обогащения путей GO и KEGG на основании заданного списка генов, в которых найдены

статистически значимые варианты, использовались ресурсы SRplot (<http://www.bioinformatics.com.cn>) и Reactome (<https://reactome.org/>).

2.3 Методы статистической обработки данных

Анализ данных проводился на персональном компьютере с использованием электронных таблиц «Microsoft Excel» и программных комплексов «Statistica for Windows» v. 7.0, StatSoft Inc. (США) и SPSS v.26.0. Размер выборки определялся с применением программы Statistica 10, и было сделано заключение: объем выборки достаточен для решения заданных задач. Все полученные количественные результаты прошли обработку с помощью метода вариационной статистики. Для каждого количественного показателя определялись следующие характеристики: среднее значение (M), стандартное отклонение (SD), медиана (Me), 25 и 75 квартили (q1-q3/LQ; UQ) и 95% доверительный интервал (ДИ). Проверка количественных данных на нормальность распределения проводилась с использованием критерия Колмогорова – Смирнова с поправкой Лиллиефорса при $n > 50$ ($p > 0.05$), оценивались показатели эксцесса и асимметрии, а также проводился анализ гистограммы (визуальный метод). Для признаков, имеющих нормальное распределение, оценивалось равенство дисперсий сравниваемых выборок с помощью критерия Ливиня ($p > 0,05$). Для сравнения количественных переменных, имеющих нормальное распределение и равенство дисперсий в каждой из сравниваемых групп, использовался t-критерий Стьюдента, при отсутствии равенства дисперсий ($p < 0,05$) использовался t-критерий Стьюдента в модификации Уэлча. При отсутствии нормального распределения данных применялись методы непараметрической статистики – U-критерий Манна – Уитни.

Для качественных данных определяли показатели абсолютного количества (абс.) и частоты (%). Анализ номинальных данных проводился с использованием хи-квадрата Пирсона и точного критерия Фишера. Так как у группирующего и изучаемого (сравниваемого) признака имелись 2 категории, следовательно, проводился анализ четырехпольной таблицы сопряженности (2×2). Далее

оценивалось минимальное предполагаемое число, при значениях которого ≥ 10 и частота явления в каждой из групп не была равна 0% или 100%, следовательно, значимость определялась по критерию хи-квадрат Пирсона, при значениях минимального предполагаемого числа < 10 использовался точный критерий Фишера, в дальнейшем проводилась оценка связи по V Крамера, и было определено ОШ (95%-й ДИ). Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Исследование связи между анализируемыми количественными параметрами основывалось на корреляционном анализе с определением коэффициентов корреляции (r) Пирсона и Спирмена, а также их значимости с применением критерия t. Корреляционные показатели оценивались согласно шкале Чеддока. Коэффициент корреляции (r) менее 0,3 считался незначимым, от 0,3 до 0,5 – умеренной силы, 0,5–0,7 – заметной, а более 0,7 – сильной (высокой) корреляционной зависимостью.

С использованием ROC-анализа определялись наиболее значимые диагностические маркеры, а также оценивалась эффективность бинарной классификации. Качество модели в зависимости от AUC (площадь под кривой) определялось по градации: 0,9–1,0 – отличное; 0,8–0,9 – очень хорошее; 0,7–0,8 – хорошее; 0,6–0,7 – среднее; до 0,6 – неудовлетворительное. Прогностическая значимость исследуемых показателей оценивалась на основе результатов ROC-анализа.

Для анализа воздействия разнообразных независимых переменных на формирование одного признака применялся метод регрессионного анализа (бинарная логистическая регрессия, многофакторная логистическая регрессия). Вероятность наступления события определялась с использованием соответствующей формулы:

$$p = z * 100\% = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + \dots + a_nx_n, \quad (2)$$

где p – логистическая функция (вероятность наступления изучаемого события);

z – индикатор степени в логистической функции;

x – независимые параметры (факторы);

a_0 – const, константа,

$a_1...a_n$ – коэффициенты регрессии.

Наиболее значимые факторы риска выявлялись с использованием логистического регрессионного анализа, формирования уравнения логистической регрессии, создания ROC-кривой, определения площади под кривой (AUC), вычисления доверительного интервала, чувствительности, специфичности и диагностической точности. Для анализа связи между несколькими независимыми переменными (предикторами) и зависимой переменной использовался метод многофакторной регрессии. Оценка воздействия факторов риска включала расчет отношения шансов (ОШ) с указанием 95%-го доверительного интервала. Определение анализа выживаемости проводилось с использованием метода Каплана – Майера и таблиц дожития. Была определена медиана срока дожития, соответствующая предполагаемому сроку проведения ТП не менее, чем у 50% пациентов, среднее время от проведения операции Касаи до проведения ТП, оценена выживаемость с нативной печенью за 18-летний период наблюдения.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Клинические симптомы билиарной атрезии и сроки их манифестации в неонатальный период

Был выполнен проспективно-ретроспективный анализ историй болезней 170 детей с подтвержденным диагнозом БА. Все пациенты родились в период с августа 2001 года по декабрь 2020 года. 158 детей (которые составляют 93%) были доношенными, с массой тела при рождении 3290 ± 447 г, а 12 детей (7%) родились недоношенными на сроке гестации 33–36 недель, с массой тела при рождении 2293 ± 343 г. Двойнями родились 4 детей (2,3%). У 5 детей (3%) обнаружена кистозная форма БА, у 4 детей (2,3%) выявлен синдром BASM, а 3 детей (1,7%) родились от близкородственного брака [4].

Операция Касаи была выполнена для 163 детей в возрасте от 28 до 138 дней. Средний возраст пациентов на момент проведения операции составлял 78,8 (15,2) дней [4].

В зависимости от сроков выполнения операции дети были распределены следующим образом: 1 ребенок был прооперирован в возрасте до 30 дней, 32 детям в возрасте от 31 до 60 дней, 77 детям в возрасте от 61 до 90 дней, 44 пациентам в возрасте от 91 до 120 дней и 9 пациентам старше 121 дня (Рисунок 6).

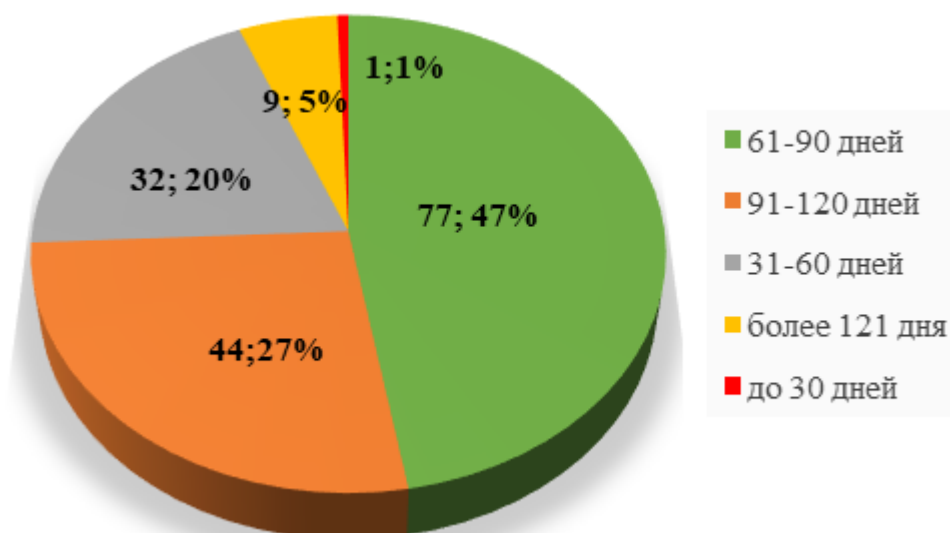


Рисунок 6 – Возраст детей с БА на момент проведения операции Касаи

Представленные данные иллюстрируют чрезвычайно низкий уровень выявления заболевания в течение первых 30 дней жизни.

Среди обследованных детей был проведен анализ частоты развития геморрагического синдрома в неонатальном периоде. У 33/170 детей (19,4%) в возрасте 22 (4) дней отмечалось развитие геморрагического синдрома различной локализации: внутричерепные кровоизлияния у 7/33 детей (21%), последствием чего стала различная степень неврологических нарушений – от синдрома мышечной дистонии до гемипареза и задержки моторного и психоречевого развития. Гематомы мягких тканей и кожный геморрагический синдром у 13/33 детей (40%), кровотечения из желудочно-кишечного тракта у 3/33 (9%), кровотечения из пупочной ранки у 3/33 (9%) и мест венепункций у 7/33 (21%) [8]. Патогенез этого состояния связан с отсутствием поступления желчных кислот в кишечник и нарушением абсорбции жирорастворимых витаминов, среди которых витамин К. Это осложнение может быть предотвращено при своевременной диагностике и введении витамина К [4].

При анализе клинических проявлений в неонатальном периоде сроки появления желтухи удалось установить у 142 детей – было выявлено, что у 115/142 детей (81%) желтуха появилась на 1 неделе жизни, из них у 5 детей желтуха сочеталась с гемолитической болезнью новорожденных по системе АВО и появилась с 1-[суток жизни, у 17/142 (12%) детей иктеричность кожных покровов выявлена после 7 суток жизни (таблица 1). У 10/142 детей (7%) со слов родителей и медицинской документации не было указаний на наличие желтухи в неонатальный период [4, 8]. У 28 детей не удалось установить сроки появления желтухи [8].

У 91/170 пациента (53,5%) ахолия стула появилась в течение первой недели жизни после отхождения мекония, у 47/170 (27,6%) пациентов отмечено появление обесцвеченного стула со 2–3-й недели жизни. У 32/170 детей (18,8%) отсутствовали данные о сроках появления обесцвеченного стула [4] (Таблица 1). Несмотря на появление обесцвеченного стула у более чем 80% детей в течение первого месяца жизни, данный симптом не вызвал настороженность в большинстве случаев, что,

вероятно, связано с недостаточной осведомленностью родителей о нормальном цвете стула у новорожденного ребенка [4]. Представленные данные стали основанием для разработки карты стула новорожденного, позволяющей своевременно выявить обесцвеченный стул (Рисунок 7). Данная карта выдается родителям на руки при выписке из родильного дома.



Рисунок 7 – Карта стула новорожденного

Примечание – Первые 3 цвета отражают ахоличный стул, который может варьировать в зависимости от вида вскармливания. Цвета с 4 по 8 соответствуют нормально окрашенному стулу [4]

Данные о размерах печени и селезенки при пальпации в ранний неонатальный период установлены у 90/170 детей (53%) [4]. Увеличение печени отмечено у 3/90 детей (3%), тогда как у 87/90 детей (97%) размеры печени были в пределах нормы. Селезенка у всех пациентов не пальпировалась [4].

В ранний неонатальный период из 115 детей с желтухой исследование билирубина проводилось только 97 новорожденным: у 70 проводилось исследование исключительно общего билирубина без оценки прямой фракции. И только у 27/115 детей с желтухой (16%) исследовались обе фракции билирубина (Таблица 1). У всех обследованных отмечено повышение как общего 207 (48) мкмоль/л, так и прямого билирубина 84 (35) мкмоль/л [4]. У всех обследованных детей уровень прямого билирубина на 1-й неделе жизни был $> 17,1$ мкмоль/л. Другие биохимические маркеры холестаза (ЩФ, ГГТ) и синдрома цитолиза

(уровень АЛТ, АСТ) в неонатальном периоде исследовались 16 пациентам в среднем в возрасте 4,2 (2,7) дней (от 2 до 12 дней) и были в пределах нормы [4].

Таблица 1 – Частота выявления основных симптомов билиарной атрезии в неонатальном периоде

<i>Симптомы в неонатальном периоде</i>	<i>Кол-во обследованных от общего числа пациентов (n = 170), n (%)</i>
Наличие желтухи	142 (100%)
< 7 дней жизни	115 (81%)
> 7 дней жизни	17 (12%)
Отсутствие желтухи	10 (7%)
Отсутствие данных о наличии желтухи	28
Наличие ахолии стула	138 (81%)
< 7 дней жизни (после мекония)	91 (53,6%)
На 2–3-й неделе жизни	47 (27,6%)
Отсутствие данных о наличии ахолии стула	32 (18,8%)
Оценка билирубина по фракциям (возраст < 7 дней жизни)	27 (16%) M (SD)
Общий билирубин (О.Б.)	207 (48) мкмоль/л
Прямой билирубин (П.Б.)	84 (35) мкмоль/л
П.Б > 17,1 мкмоль/л на 1-й неделе жизни	27 из 27 (100%)
УЗИ органов брюшной полости (возраст < 7 дней жизни)	58 (34%)
Уменьшение просвета ЖП	30 из 58 (52%)
ЖП не визуализировался	28 из 58 (48%)
Отсутствие гепатоспленомегалии	58 из 58 (100%)
Нормальная эхоструктура печени/селезенки	58 из 58 (100%)
Отсутствие симптома треугольного рубца	58 из 58 (100%)

У большинства детей с БА в течение первого месяца жизни отмечалась желтуха в сочетании с обесцвеченным стулом [4], однако исследование прямой фракции билирубина на 1-й неделе жизни выполнено только в 16% (27/170) случаев, у всех ПБ был > 17,1 мкмоль/л.

УЗИ органов брюшной полости на 1 неделе жизни было проведено только 58/170 детям (34%). У всех обследованных отсутствовали патологические изменения печени и селезенки, их размеры и структура были в пределах нормы, ни у одного ребенка не выявлен характерный для БА симптом «треугольного рубца» [4]. Из 58 обследованных у 30 (52%) детей отмечалось уменьшение просвета ЖП и

у 28/58 (48%) новорожденных ЖП при проведении исследования не визуализировался [4]. Однако такая УЗ картина может встречаться и у здоровых детей, так как исследование в родильном доме часто проводится после кормления и ЖП может быть частично или полностью сокращен [4]. Рисунок 8 демонстрирует результат УЗИ ребенка с билиарной атрезией в сравнении со здоровым новорожденным в возрасте 3 дней жизни.

Важно отметить, что, учитывая нормальные размеры и эхогенность паренхимы печени, а также проведение УЗИ после кормления ребенка, выявленные изменения ЖП в большинстве случаев рассматривались как вариант нормы и не вызывали настороженность.

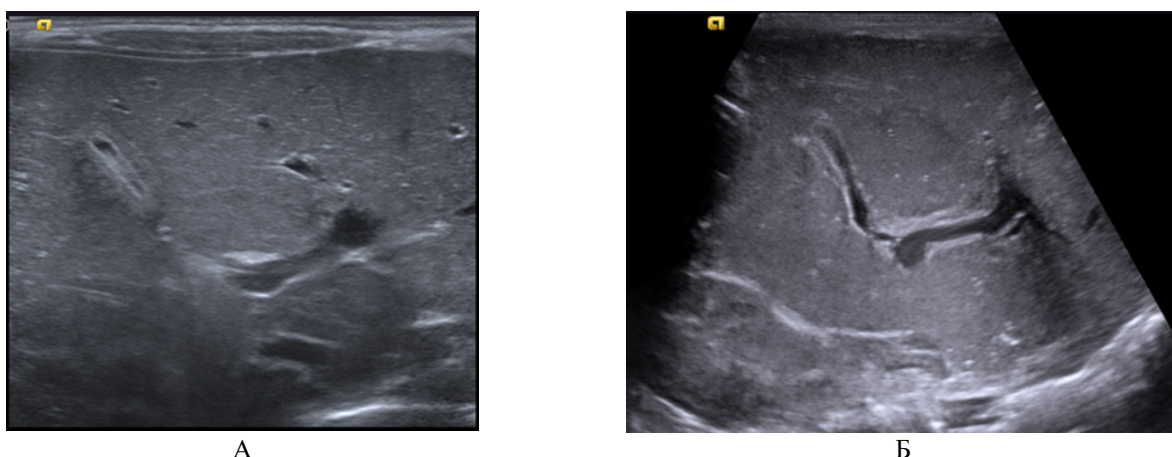


Рисунок 8 – Эхограмма печени и желчного пузыря

Примечание – А – ребенок с БА, 3-и сутки жизни, ЖП уменьшен в размерах через 4 часа после кормления, стенки утолщены до 1,5 мм; Б – здоровый новорожденный, 3-и сутки жизни, желчный пузырь частично сокращен через 1,5 часа после кормления [4]

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о неспецифичности клинических проявлений в неонатальный период и поздней диагностике БА. Желтуха у более чем половины детей (67,7%) появилась на первой неделе жизни, в сроки появления физиологической желтухи, и не вызывала настороженности у врачей. Ахолия стула является патогномоничным симптомом заболевания, однако ее появлению предшествовало отхождение мекония. Ахолия становилась заметной лишь после выписки ребенка из родильного дома, что определяет важность использования карты стула. Наиболее ранним и чувствительным показателем, позволяющим заподозрить БА, считается

повышение уровня ПБ $> 17,1$ мкмоль/л, выявленный у всех обследованных пациентов [4]. Однако данное исследование не является рутинным и было выполнено только у 16% детей. Из инструментальных методов наиболее информативным служит УЗИ органов брюшной полости, но оно редко проводится новорожденным после голодной паузы [4], а это значит, что отсутствие визуализации либо уменьшение размеров желчного пузыря может быть вариантом нормы. Поздняя диагностика БА может приводить к развитию геморрагического синдрома, обусловленного дефицитом витамина К-зависимых факторов свертываемости крови, выявленное у 19,4% исследованных детей [4].

На основании полученных данных нами разработан алгоритм обследования новорожденных детей в родильном доме, направленный на раннюю диагностику БА (Рисунок 9). Данный алгоритм включает 3 ключевых показателя: цвет стула ребенка, уровень прямого билирубина и данные УЗИ [4].



Рисунок 9 – Алгоритм обследования новорожденного, направленный на раннюю диагностику билиарной атрезии

С целью правильной оценки цвета стула в родильном доме и на протяжении 1-го месяца жизни после выписки целесообразно использовать карту стула новорожденного [4].

При оценке гипербилирубинемии у новорожденных с желтухой проводится оценка прямой фракции билирубина наряду с общей [4]. Повышение ПБ $> 17,1$ мкмоль/л свидетельствует о высоком риске холестатического заболевания печени и БА в том числе.

В случае выявления ахолии стула и/или повышения прямой фракции билирубина показано проведение УЗИ органов брюшной полости строго натощак не менее, чем через 3,5–4 часа после кормления [4].

Внедрение комплексной оценки выше представленных показателей будет способствовать ранней диагностики БА и позволит предупредить развитие жизнеугрожающих осложнений.

Пример № 1

Ребенок А. (девочка), родилась у соматически здоровой женщины 40 лет, от 4-й беременности (1-я беременность: родилась девочка, умерла от лейкоза в возрасте 5 лет; 2 беременность: родился здоровый мальчик; 3-я беременность: медицинский аборт). Данная беременность протекала на фоне артериальной гипертензии, отеков и угрозы прерывания в III триместре. Роды 3-и, путем операции кесарево сечение на 38-й неделе. Масса тела при рождении 2760 г, длина 50 см. Состояние при рождении расценено как удовлетворительное, оценка по шкале Апгар 8/9 баллов [196]. Вскармливание грудное, профилактика геморрагической болезни не проводилась. В первые 2 суток жизни появилась желтуха и расценивалась как физиологическая, размеры печени и селезенки при осмотре не увеличены, со слов матери с 3-х суток у ребенка появился светлый стул (салатовый). Перед выпиской в возрасте 4 суток жизни в связи с нарастанием желтухи проведено исследование общего билирубина (247 мкмоль/л), прямая фракция не исследовалась, также было проведено УЗИ органов брюшной полости (исследование проводилось через 20–30 минут после кормления): выявлен частично сокращенный ЖП, очаговых изменений не выявлено. На 5-е сутки жизни

ребенок с диагнозом: конъюгационная желтуха новорожденных, выписан домой. В возрасте 27 дней жизни у ребенка появился геморрагический синдром: кровоточивость со слизистой оболочки носа, гематома в области правого локтевого сустава, также отмечалась выраженная вялость и обильные срыгивания. Девочка госпитализирована в стационар, где по результатам обследования выявлены: двусторонние эпидуральные гематомы. В связи с этим проведено оперативное лечение. При дальнейшем дообследовании установлен диагноз билиарной атрезии и в возрасте 2 месяцев жизни проведено оперативное лечение по поводу билиарной атрезии – гепатопортоэнтеростомия (операция Касаи) [196].

Таким образом, у ребенка с желтухой на 4-е сутки жизни при проведении биохимического анализа крови был исследован исключительно общий билирубин без оценки прямой фракции, наличие ахолии стула не вызвало настороженности у неонатолога. УЗИ органов брюшной полости было проведено после кормления, что не позволило правильно интерпретировать и оценить размеры желчного пузыря. В связи с тем, что у ребенка не было своевременно заподозрено холестатическое заболевание печени, не назначена терапия витамином К, это привело к развитию жизнеугрожающего состояния: геморрагической болезни, обусловленной дефицитом витамин К зависимых факторов.

Пример № 2

Ребенок М. (мальчик) родился у соматически здоровой женщины 34 лет, от 3-й беременности (1-я беременность: родилась девочка, пузырно-мочеточниковый рефлюкс; 2-я беременность: родился здоровый мальчик). Данная беременность протекала на фоне тяжелого токсикоза в I и II триместрах, в III триместре острый пиелонефрит. Роды 3-и, самостоятельные, на 39-й неделе гестации. Состояние при рождении удовлетворительное, оценка по шкале Апгар 8/9 баллов. Масса тела при рождении 4250 г, длина 55 см. Желтуха у ребенка появилась на 2-е сутки жизни. На 4-е сутки жизни в связи с сохранением желтушного синдрома проведено исследование уровня билирубина: общий билирубин 179,2 мкмоль/л, прямой билирубин – 63,3 мкмоль/л (35,3% от общего).

В связи с наличием у ребенка прямой гипербилирубинемии проведено дообследование: по данным биохимического анализа крови: АЛТ – 18,1 (0–49), АСТ – 58,8 (0–97), ГГТ – 530 Ед/л (12–185). Проведено исследование коагулограммы: протромбиновое время – 68 сек (15–17), ПТИ – 22% (80–100), МНО – 2,9 (1,05–1,35), фибриноген – 1,79 г/л (2.83–4.01), тромбиновое время – 15,8 сек (< 21), АЧТВ – 31,6 сек, (31.2–44.0), антитромбин III – 55% (72–134).

В связи с наличием гипокоагуляционных изменений, характерных для дефицита витамин К-зависимых факторов, ребенку проведена терапия менадиона натрия бисульфитом в течение 3 дней. При контрольном исследовании отмечалась нормализация показателей коагулограммы: протромбиновое время – 16 сек (15–17), ПТИ – 97% (80–100), МНО – 1,02 (1,05–1,35) фибриноген – 3,84 г/л (2.83–4.01) тромбиновое время 18,3 сек (< 21 сек), АЧТВ – 35,1 сек, (31.2–44.0) Анти тромбин III – 68% (72–134).

При дальнейшем дообследовании: УЗИ органов брюшной полости после 4-часовой голодной паузы; в проекции ЖП определяется гипоплазированная структура размерами 15×2 мм. Размеры и ЭХО-структура печени и селезенки в пределах возрастной нормы. Стул первые 3 суток меконий, далее переходный/гипохолия.

В дальнейшем ребенку было проведено дообследование, исключен ряд заболеваний, сопровождающихся неонатальным холестазом, установлен диагноз билиарная атрезия в течение 1-го месяца жизни. В оптимальные сроки проведено оперативное лечение, портоэнтеростомия (операция Касаи).

Таким образом, в данном клиническом случае у ребенка в раннем неонатальном периоде, несмотря на наличие переходного стула, был заподозрен диагноз билиарной атрезии, что позволило предупредить развитие геморрагического синдрома, обусловленного дефицитом витамин К-зависимых факторов. Благодаря настороженности неонатологов и раннему выявлению холестатического поражения печени ребенку удалось исключить ряд других заболеваний и провести оперативное лечение в оптимальный срок.

3.2 Выживаемость детей с нативной печенью после операции Касаи и частота развития осложнений в группе детей с эффективной портоэнтеростомией

Для оценки выживаемости с нативной печенью у детей с билиарной атрезией была построена кривая Каплана – Майера (Рисунок 10) и таблицы дожития (Таблица 2). В анализ было включено 132 ребенка после проведения операции Касаи.

Таблица 2 – Выживаемость детей с нативной печенью после проведения операции Касаи

Сроки наблюдения, гг.	Число пациентов, оставшихся под наблюдением, чел.	Риск ТП, %		Выживаемость с нативной печенью, %
		абс.	%	
0	132			
1	69	49	39,2	60,8
2	44	67	55,9	44,1
3	37	69	58,0	42,0
4	32	69	58,0	42,0
5	24	72	62,3	37,7
6	19	73	64,0	36,0
7	17	73	64,0	36,0
8	16	74	64,0	36,0
9	15	75	66,3	33,7
10 и более	15	75	66,3	33,7

В дальнейшем в группе детей с эффективной портоэнтеростомией оценивалась частота развития послеоперационных осложнений в разных временных интервалах: после операции < 1 года, после операции, 1–2 года, 2–3 года, 3–5 лет, 5–10 лет и > 10 лет.

Оценивались такие послеоперационные осложнения, как: холангиты, портальная гипертензия, расширение внутripеченочных желчных протоков.

В Таблице 2 отражена выживаемость детей с нативной печенью при различных сроках наблюдения с момента проведения операции Касаи.

Согласно полученным данным, двухлетняя выживаемость с нативной печенью составила 44,1%, пятилетняя выживаемость с нативной печенью без показаний к проведению трансплантации печени составила 37,7%, выживаемость с нативной печенью 10 лет и более – 33,7%.

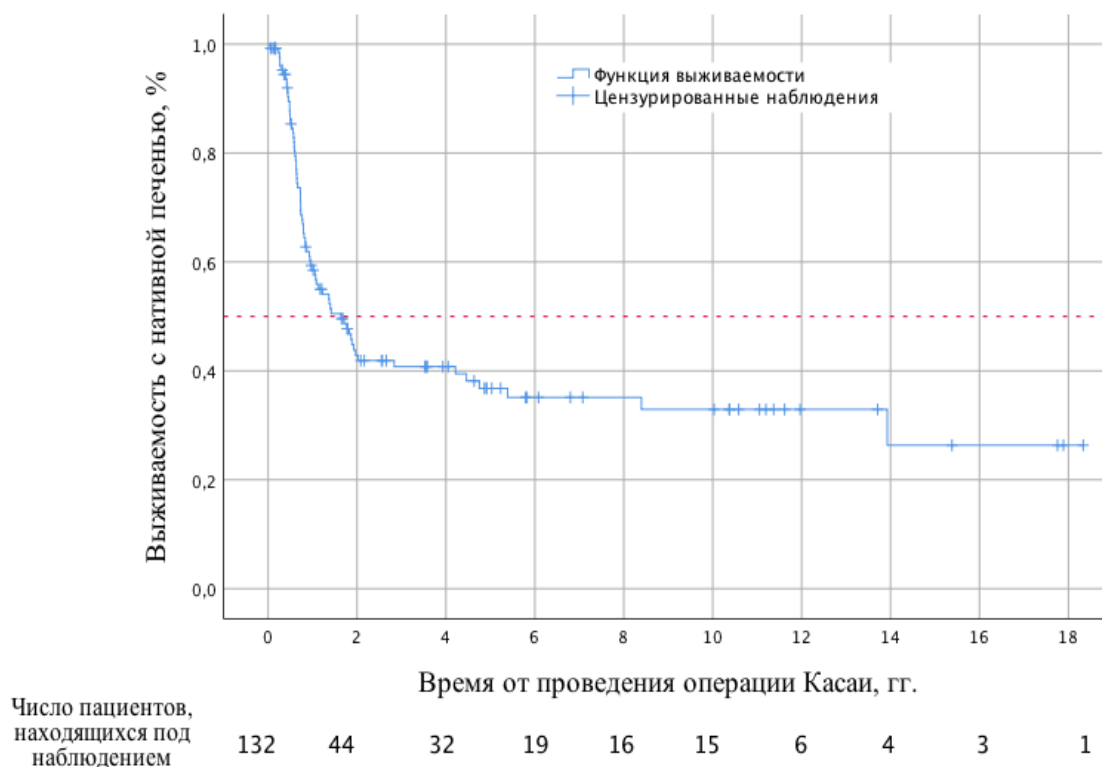


Рисунок 10 – Кривая Каплана – Мейера, характеризующая выживаемость пациентов с БА без показаний к проведению ТП

В соответствии с проведенным анализом выживаемости, медиана срока дожития, соответствующая предполагаемому сроку проведения ТП, не менее, чем у 50% пациентов составила $1,64 \pm 0,34$ лет (95%-й ДИ 0,98–2,31 года).

Среднее время от проведения операции Касаи до проведения ТП составило $6,74 \pm 0,81$ лет (95%-й ДИ 5,16–8,31 лет).

Осложнения

При изучении структуры послеоперационных осложнений в группе детей с эффективной операцией Касаи было установлено, что наиболее частыми

осложнениями в послеоперационном периоде явились бактериальный холангит и портальная гипертензия, частота которых отражена на Рисунках 11, 12.

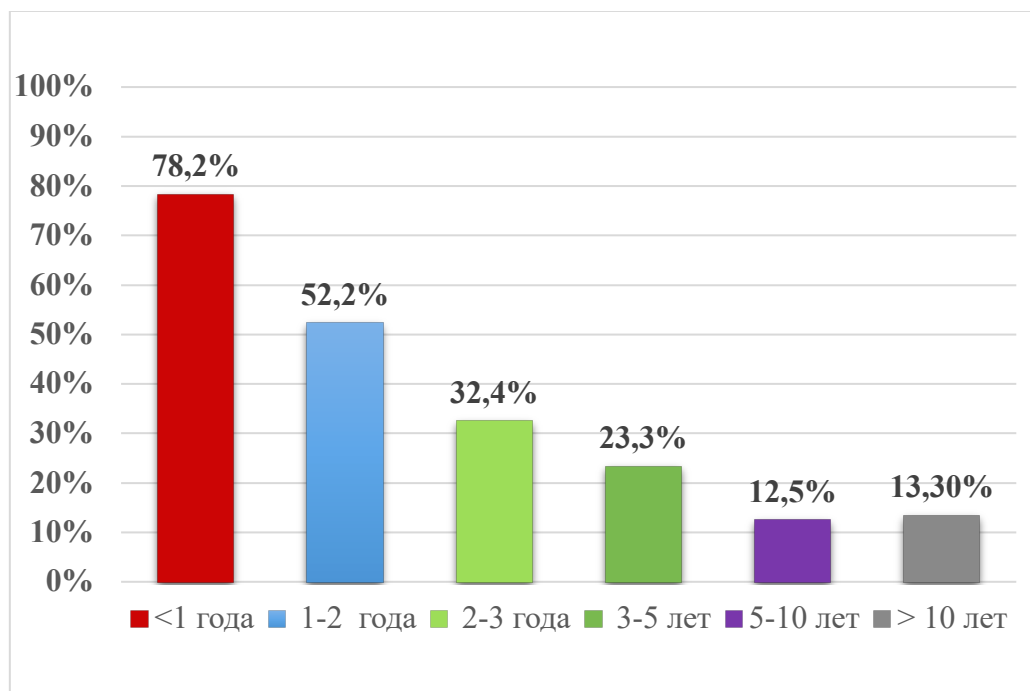


Рисунок 11 – Частота развития бактериальных холангитов в зависимости от времени с момента проведения операции Касаи

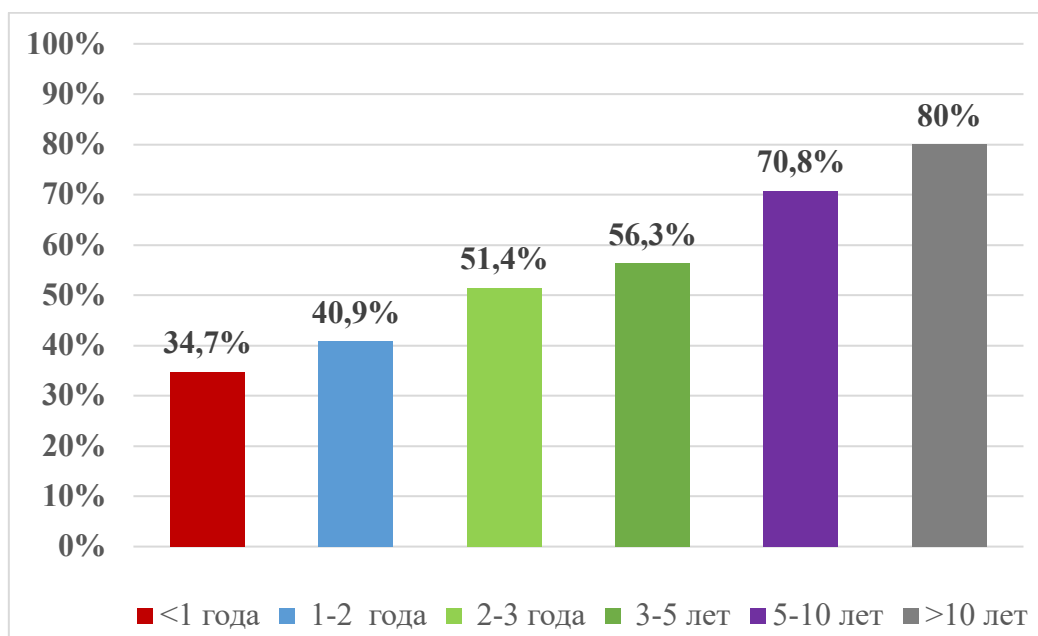


Рисунок 12 – Частота развития портальной гипертензии в зависимости от времени с момента проведения операции Касаи

Бактериальный холангит

Анализ частоты бактериальных холангитов у детей с эффективной портоэнтеростомией после проведения операции Касаи представлен на Рисунке 11.

В течение 1 года было зарегистрировано 111 эпизодов бактериального холангита у 54/69 (78,2%) детей. Количество эпизодов варьировало от 1 до 7, каждый эпизод требовал госпитализации в стационар и эскалации антибактериальной терапии.

На 1–2-м году после операции Касаи из 44 пациентов у 23 (52,2%) зарегистрировано 78 эпизодов бактериального холангита с частотой от 1 до 5 эпизодов.

На 2–3-м году из 37 пациентов у 12 (32,4%) выявлено 25 эпизодов острого бактериального холангита с частотой от 1 до 3 эпизодов.

На 3–5-м году после операции Касаи из 30 пациентов у 7 (23,3%) пациентов выявлено до 11 эпизодов холангита от 1 до 2.

При анализе детей в течение 5–10 лет после операции у 3 (12,5%) из 24 детей было зарегистрировано до 5 эпизодов острого бактериального холангита.

В группе детей с выживаемостью с нативной печенью более 10 лет после операции Касаи только у 2/15 пациентов (13,3%) выявлено по 1 эпизоду острого бактериального холангита.

Портальная гипертензия

В течение 1 года среди 69 пациентов с эффективной операцией Касаи признаки портальной гипертензии были выявлены у 24 (34,7%) пациентов. Из них у 8/24 (33,3%) детей минимальные проявления портальной гипертензии в виде реканализации пупочной вены по данным УЗИ. Следует отметить, что реканализация пупочной вены явилось транзиторным состоянием и самостоятельно купировалось у 6 пациентов в возрасте 18 месяцев. Варикозное расширение вен пищевода (ВРВП) было выявлено у 16/24 (66,6%) детей. У 10 из них варикозное расширение вен пищевода I степени, у 3 детей – ВРВП II степен, у 2 детей – ВРВП III степени и у 1 ребенка – ВРВП IV степени. У 5 пациентов развилось кровотечение из варикозно-расширенных вен пищевода и 6 детям проведена склеротерапия. У 1 пациента развилось желудочно-кишечное кровотечение с летальным исходом в возрасте 7,5 месяцев жизни.

В течение 2 года после операции из 44 пациентов, которые находились под наблюдением, у 18 (40,9%) детей развились признаки портальной гипертензии: у 3 (16,6%) пациентов – реканализация пупочной вены, у 2 (11,1%) – асцит и у 13 (72,2%) имелись признаки варикозного расширения вен пищевода (у 8 детей – ВРВП I степени, у 3 пациентов ВРВП – II степени и у 2 детей – ВРВП III степени). Гиперспленизм был выявлен у 12/18 (66,7%) детей, ассоциированный с тромбоцитопенией, у 3/18 (16,7%) пациентов имелось сочетание тромбоцитопении с анемией. 2 пациентам в возрасте 1,5 и 2,5 лет с признаками ВРВП III степени было проведено оперативное вмешательство по установке спленоренального шунта, который обеспечивает частичный отток крови из портальной системы в систему нижней полой вены. Данное вмешательство позволило уменьшить проявления портальной гипертензии.

В течении 3-го года после операции из 37 пациентов у 19 (51,4%) выявлены признаки портальной гипертензии: у 10/19 (52,6%) – реканализация пупочной вены, у 15/19 (78,9%) детей – варикозное расширение вен пищевода по данным ФЭГДС: у 8 детей – ВРВП I степени, у 5 детей – ВРВП II степени и у 2 детей – ВРВП III степени. Проявления гиперспленизма в виде тромбоцитопении выявлены у 11/19 (57,9%) детей.

При наблюдении детей на 4-м и 5-м годах после операции у 18/32 (56,3%) выявлены признаки портальной гипертензии. У 11 детей по данным УЗИ выявлена реканализация пупочной вены, у 16/32 (50%) детей имелись признаки варикозного расширения вен пищевода: у 8 детей – ВРВП I степени, у 5 детей – ВРВП II степени и у 3 детей – ВРВП III степени. Синдром гиперспленизма с наличием тромбоцитопении имелся у 10/18 (55,6%) детей, тромбоцитопения в сочетании с анемией у 3 детей.

В группе с 5–10 лет из 24 пациентов портальная гипертензия выявлена у 17 детей, что составило 70,8% от общего числа наблюдаемых. У всех детей по данным УЗИ выявлены нарушения кровотока в портальной системе в виде реканализации пупочной вены. Варикозное расширение вен пищевода по данным эндоскопического исследования выявлено у всех 17 (100%) детей: у 7 детей – ВРВП

I степени, у 7 – ВРВП II степени, у 1 ребенка – ВРВП III степени и у 2 детей ВРВП –IV степени. У 4 детей развилось желудочно-кишечное кровотечение из ВРВП, что послужило поводом для проведения склеротерапии. У 15/17 детей (88,2%) имелся гиперспленический синдром.

В группе детей с нативной печенью > 10 лет из 15 пациентов у 12 (80%) имеются признаки портальной гипертензии в виде реканализации пупочной вены по данным УЗИ и выявления ВРВП по данным эндоскопического исследования (ВРВП I ст. – у 5 пациентов; ВРВП II ст. – у 4 пациентов; ВРВП III-IV – у 3 пациентов). Гиперспленизм с наличием тромбоцитопении у 12/12 (100%) детей, тромбоцитопения в сочетании с анемией – у 10/12 (83,3%). У 2 пациентов развилось кровотечение из варикозно-расширенных вен пищевода, 1 пациенту проведена склеротерапия.

Расширение внутрипеченочных желчных протоков

Расширение внутрипеченочных протоков в течение 1-го года после успешной ПЭ было выявлено у 6/69 (8,7%) пациентов, у 5/44 (11,3%) детей – на 2-м году после операции и у 4/37 (10,8%) на 3-м году наблюдения после операции (Рисунок 13). В большинстве случаев имелось незначительное расширение внутрипеченочных желчных протоков (0,5–4,5 мм) без признаков билиарной обструкции. У 3 пациентов отмечалось значимое расширение внутрипеченочных желчных протоков на фоне рецидивирующего течения холангита. Данным пациентам было проведено повторное оперативное вмешательство по установке цистоэнтероанастомоза, что позволило избежать дальнейшего расширения внутрипеченочных желчных протоков.

В группе детей, которые находились под наблюдением через 3–5 лет после успешной операции Касаи из 32 детей, расширение внутрипеченочных желчных протоков было выявлено у 5 (15,6%). У 4/24 (16,6%) детей в группе с 5–10 лет. И у 2/15 (13,3%) пациентов в группе наблюдения более 10 лет после успешной ПЭ. Следует отметить, что наличие расширения внутрипеченочных желчных протоков не приводило к нарушению функционального состояния печени. Данные изменения выявлялись по результатам ультразвукового обследования.

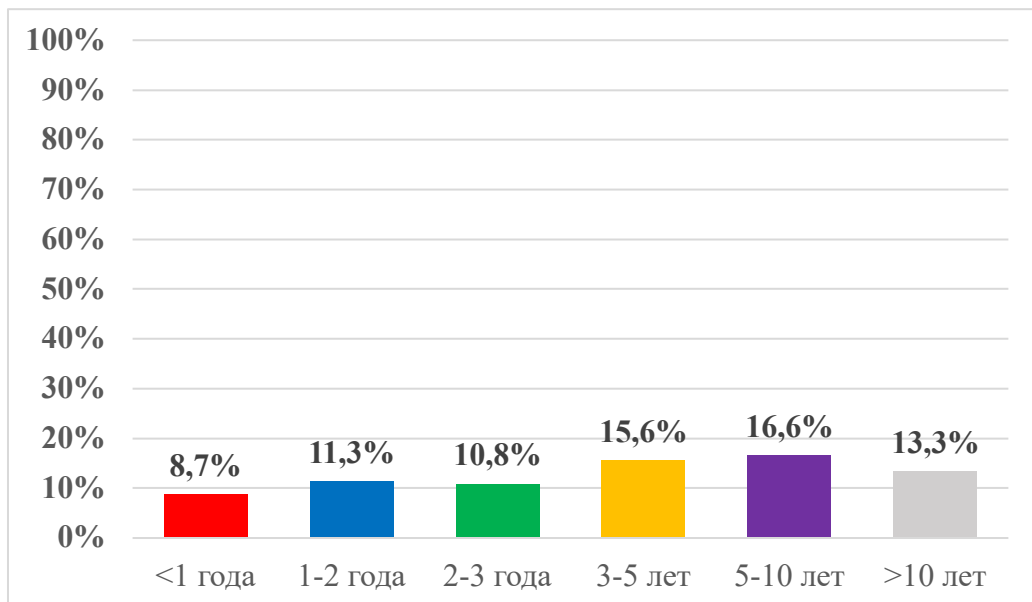


Рисунок 13 – Частота встречаемости расширения внутрипеченочных желчных протоков в зависимости от времени с момента проведения операции Касаи

При динамическом наблюдении за пациентами с эффективной портоэнтеростомией наиболее частым осложнением в течение первых 3 лет после операции явился рецидивирующий бактериальный холангит, который впоследствии приводил к развитию цирроза печени. Частота развития бактериального холангита снижалась со временем от момента проведения операции Касаи, в то время как частота портальной гипертензии увеличивается с возрастом пациентов. Полученные результаты подчеркивают критическую важность динамического наблюдения пациентов с БА, несмотря на эффективность операции, для своевременного выявления и эффективного лечения послеоперационных осложнений.

3.3 Неинвазивные маркеры фиброза и цирроза печени у детей с билиарной атрезией

В данное исследование вошло 166 детей (93 девочки и 73 мальчика) с БА, которым в период с сентября 2002 г. по декабрь 2021 г. была проведена операция Касаи, в ходе которой проводился забор ткани печени с последующим гистологическим исследованием биоптата и оценкой степени фиброза печени по

шкале Десмет [6]. Результаты представлены в Таблице 3. Был проведен сравнительный и корреляционный анализ клинико-лабораторных, ультразвуковых параметров (исследования проводились за 1–3 дня до операции) в зависимости от степени фиброза печени.

Таблица 3 – Степень фиброза печени, оцененная по шкале Десмет, у пациентов с билиарной атрезией

<i>Степень фиброза по шкале Десмет, балл</i>	<i>Количество пациентов, n (%), N = 166</i>
0	2(1,2%)
1	20 (12,1%)
2	86 (51,8%)
3	25 (15,1%)
4	33 (19,8%)

Учитывая небольшое количество пациентов (2/166 [1,2%]) с отсутствием фиброза – 0 баллов, и с минимально выраженным фиброзом (20/166 [12,1%]) – 1 балл по шкале Десмет, все исследуемые дети были разделены на 2 группы: I группа с отсутствием/умеренным фиброзом 0–2 (F 0-2) – 108 детей, во II группу вошло 58 детей с выраженным фиброзом/циррозом печени 3–4 (F3-4) [6].

Основные характеристики групп и сравнительный анализ клинико-лабораторных показателей до проведения операции Касаи (за 1–3 дня) представлен [6] в Таблице 4.

По данным морфологического исследования у 2/166 (1,2%) пациентов отсутствовали признаки фиброза печени (0 балл), у 20/166 (12,1%) имелись слабые признаки фиброза (1 балл), у 86/166 (51,8%) пациентов умеренный фиброз (2 балла), у 25/166 (15,1%) выраженный фиброз (3 балла) и у 33/166 пациентов (19,8%) на момент проведения операции Касаи и биопсии печени имелись признаки цирроза и структурной перестройки печени.

Проведенный анализ выявил статистически значимые различия в возрасте детей на момент проведения биопсии печени, уровне АЛТ, АСТ и индексе APRI [6].

Таблица 4 – Сравнительный анализ клинико-лабораторных данных до проведения операции Касаи в зависимости от степени фиброза по шкале Десмет [6]

Параметры	<i>F 0–2, N = 108</i>	<i>F 3–4, N = 58</i>	<i>p</i>
	Me [LQ–UQ]	Me [LQ – UQ]	
Возраст на момент проведения биопсии печени, дни	75 [60–85]	92 [79,5–99,5]	< 0,001*
Тромбоциты, *10 ⁹ /л	447 [285–546,5]	377 [277–506]	0,491
Альбумин, г/л	39 [36,2–41,3]	39,6 [36,6–42,0]	0,703
ХЭ, Ед/л	6082 [4764–6835]	6423[5324–7029]	0,431
ГГТ, Ед/л	609,3 [369,6–778,6]	532 [454,2–795,7]	0,736
ХС, ммоль/л	5,85 [4,46–7,17]	5,57 [4,87–7,02]	0,761
Билирубин общий, мкмоль/л	154,8 [124,1–187,2]	150,9 [129,2–188,7]	0,835
Билирубин прямой, мкмоль/л	91,3 [76,9–112,2]	85,25 [72,8–112,6]	0,472
АЛТ, Ед/л	128,3 [72,1–190,6]	203,5 [131,2–267,0]	0,003*
АСТ, Ед/л	179,7 [128,2–275,0]	262,8 [217,6–348,0]	0,003*
Фибриноген, г/л	2,4 [2,0–2,6]	2,4 [1,9–2,6]	0,927
МНО	1,06 [0,99–1,1]	1,04 [0,97–1,09]	0,609
ТВ, сек	18,7 [17,1–20,0]	18,7 [17,1–20,7]	0,75
ПТИ, %	95,9 [90,2–108]	97,7 [91,0–109]	0,549
APRI	1,04 [0,82–1,80]	1,82 [1,39–2,45]	0,009*
AAR	1,53 [1,26–1,88]	1,46 [1,34–2,03]	0,697
Р-ры печени: п/п линия, см из-под края реберной дуги	4[3,0–4,5]	4 [3,0–5,5]	0,241
Р-ры печени: среднеключичная линия, см из-под края реберной дуги	3,5 [3,0–4,0]	4 [3,0–4,8]	0,438
Р-ры селезенки, см из-под края реберной дуги	1,5[0,5–3,5]	0,5 [0,5–3,2]	0,778
<i>Примечание</i> –* – различия показателей статистически значимы ($p < 0,05$)			

Согласно полученным данным, степень выраженности фиброза статистически значимо повышалась с возрастом детей ($p < 0,001$) [6] (Рисунок 14). В группе детей с выраженным фиброзом/циррозом печени показатели АЛТ ($p = 0,003$), АСТ ($p = 0,003$) и APRI ($p = 0,009$) были статистически значимо выше, чем в группе детей без или умеренно выраженными признаками фиброза [6].

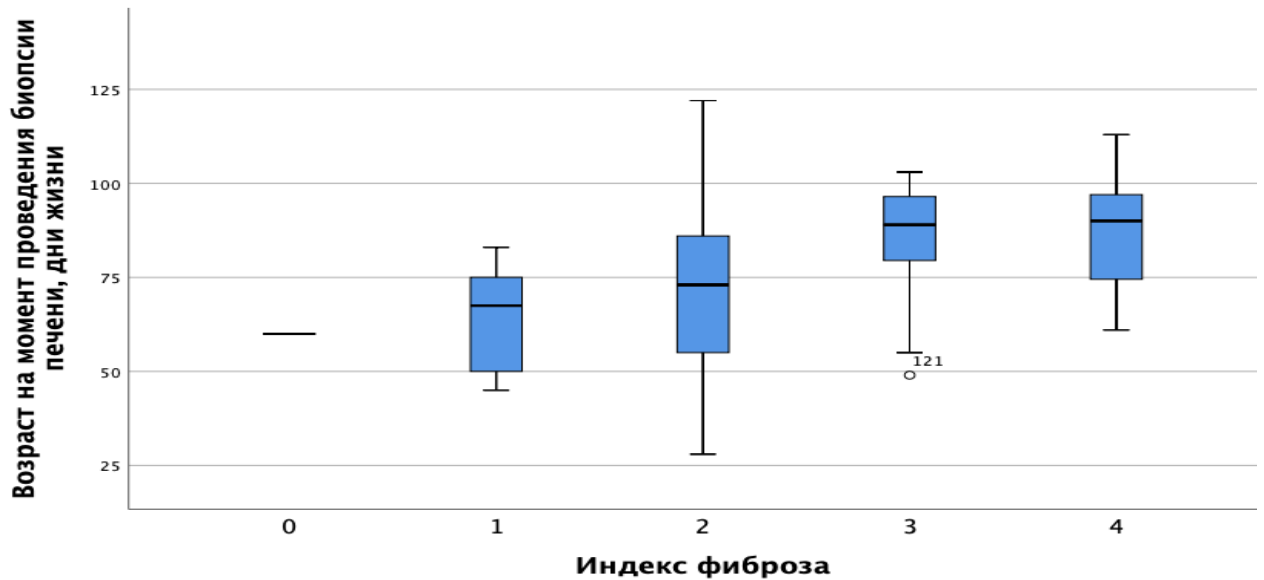


Рисунок 14 – Сравнение индекса фиброза печени по шкале Десмет в зависимости от возраста на момент проведения биопсии печени [6]

Результаты сравнительного анализа ультразвуковых и доплерографических параметров у детей с БА до проведения операции Касаи представлены [6] в Таблицах 5, 6.

Таблица 5 – Сравнительный анализ ультразвуковых данных до проведения операции Касаи в зависимости от степени фиброза печени, оцененной по шкале Десмет [6]

Параметры	<i>F 0–2, N = 108</i>	<i>F 3–4, N = 58</i>	<i>p</i>
	Me [LQ–UQ]	Me [LQ – UQ]	
Длина ЖП, мм	12 [8,0–17,0]	10 [7,5–17]	0,544
Ширина ЖП, мм	3,5 [3,0–4,4]	3,5 [3,0–4,0]	0,970
Фиброзная площадка, мм	2,9 [0–3,5]	3,5 [0–4,1]	0,050
Правая доля ПЗ р-р, мм	68 [62–74,5]	72 [67–75,5]	0,113
Левая доля ПЗ р-р, мм	42,5 [39,5–49,5]	45,0 [39,0–49,0]	0,666
Селезенка длина, мм	57 [50,5–63]	63 [56–68]	0,013*
Селезенка ширина, мм	28,0 [24,0–30,5]	27,0 [24,0–29,0]	0,786
<i>Примечание – * – различия показателей статистически значимы (p < 0,05)</i>			

Таблица 6 – Сравнительный анализ доплерографических параметров у детей с билиарной атрезией до проведения операции Касаи [6]

Параметры	<i>F 0-2, N = 108</i>	<i>F 3-4, N = 58</i>	<i>p</i>
	Me [LQ-UQ]	Me [LQ - UQ]	
Печеночная артерия, ИР	0,70 [0,68-0,74]	0,73 [0,69-0,76]	0,220
Печеночная артерия, скорость кровотока, см/сек	62,0 [40,0-72,0]	57,5 [50,0-65,2]	0,688
Печеночная артерия диаметр, мм	1,80 [1,55-2,25]	2,25 [2,00-2,60]	0,022*
Воротная вена диаметр, мм	4,0 [3,75-4,5]	4,0 [3,9-4,9]	0,598
Индекс Допа/Двв	0,41 [0,36-0,55]	0,57 [0,36-0,55]	0,029*
Воротная вена, скорость кровотока, см/сек	21,0 [20,0-23,5]	20,5 [16,0-22,0]	0,600
<i>Примечание – * – различия показателей статистически значимы (p < 0,05)</i>			

При сравнении ультразвуковых параметров в зависимости от выраженности фиброза были установлены статистически значимые различия в размерах фиброзной площадки ($p = 0,05$), индексе Допа/Двв ($p = 0,029$), в диаметре печеночной артерии ($p = 0,022$) и длине селезенки ($p = 0,013$) [6]. Размеры фиброзной площадки, индекс Допа/Двв, длина селезенки и диаметр общей печеночной артерии были статистически значимо выше в группе детей с выраженным фиброзом/циррозом печени [6].

В дальнейшем нами был проведен корреляционный анализ между основными клинико-лабораторными и ультразвуковыми показателями и степенью выраженности фиброза [6] (Таблица 7).

Таблица 7 – Основные клинико-лабораторные и ультразвуковые показатели и их корреляция со степенью выраженности фиброза по шкале Десмет у детей с БА на момент проведения операции Касаи [6]

Параметры	Me [LQ - UQ]	<i>Шкала фиброза печени по Десмет</i>	
	(N = 166)	r_s	p
Возраст на момент проведения биопсии печени, дни	80 [63,0-94,5]	0,805	< 0,001*
Тромбоциты, *109/л	383 [301-522]	-0,164	0,163
Альбумин, г/л	39,2 [36,4-41,8]	-0,025	0,819
ХЭ, Ед/л	6415,2 [5119,8-7179,3]	0,129	0,300
ГГТ, Ед/л	592,9 [391,8-827,1]	-0,140	0,211

Продолжение таблицы 7

Параметры	Me [LQ–UQ]	Шкала фиброза печени по Десмет	
	(N = 166)	r _s	p
ХС, ммоль/л	5,69 [4,36–7,00]	-0,078	0,490
Билирубин общий, мкмоль/л	156 [127–189]	0,051	0,630
Билирубин прямой, мкмоль/л	91,4 [76,9–119,2]	-0,036	0,733
АЛТ, Ед/л	153 [96,0–245]	0,355	0,001*
АСТ, Ед/л	223 [157–323,5]	0,370	< 0,001*
Фибриноген, г/л	2,3 [1,9–2,7]	-0,086	0,446
МНО	1,0 [0,9–1,1]	0,052	0,682
ТВ, сек	18,8 [17,3–20,6]	0,075	0,544
ПТИ, %	95,9 [86,5–108,8]	-0,039	0,742
APRI	1,4 [0,88–2,2]	0,827	0,001*
AAR	1,51 [1,22–1,93]	-0,057	0,601
Р-ры печени: п/п линия, см из-под края реберной дуги	4,0 [4,0–5,0]	0,265	0,114
Р-ры печени: среднеключичная линия, см из-под края реберной дуги	4,0 [3,0–4,0]	0,225	0,194
Р-ры селезенки, см из-под края реберной дуги	1,5 [0,5–3,0]	0,115	0,454
Длина ЖП, мм	12,0 [8,25–17,0]	-0,099	0,460
Ширина ЖП, мм	3,5 [3,0–5,0]	0,093	0,504
Фиброзная площадка, мм	3,0 [0–3,9]	0,151	0,215
Индекс Допа/Двв	0,5 [0,38–0,65]	0,683	0,047*
Правая доля ПЗ р-р, мм	70,0 [65,0–75,5]	0,098	0,378
Левая доля ПЗ р-р, мм	44,0 [39,75–50,0]	-0,070	0,566
Селезенка длина, мм	60,0 [53,0–67,0]	0,686	0,010*
Селезенка ширина, мм	27 [24–30]	-0,032	0,774
Печеночная артерия ИР	0,73 [0,69–0,77]	0,639	0,045*
Печеночная артерия, скорость кровотока см/сек	59,5 [42,0–70,0]	0,062	0,760
Печеночная артерия диаметр, мм	2,0 [1,6–2,5]	0,749	0,042
Воротная вена диаметр, мм	4,0 [3,7–4,6]	0,017	0,894
Воротная вена, скорость кровотока, см/сек	21 [19–24]	-0,007	0,963

Примечание – * – различия показателей статистически значимы (p < 0,05)

Сильная, высокая, прямая корреляционная зависимость была выявлена между возрастом на момент проведения биопсии печени и степенью фиброза ($r_s = 0,805$; $p < 0,001$) [6]. Между АСТ, АЛТ и степенью фиброза печени по шкале Десмет была установлена статистически значимая прямая умеренная корреляционная связь ($r_s = 0,370$ $p < 0,001$, $r_s = 0,355$ $p < 0,001$, соответственно) [6].

При сопоставлении APRI и индекса фиброза печени по шкале Десмет была установлена статистически значимая прямая, сильная корреляционная связь, оцененная по шкале Чеддока ($r_s = 0,827$; $p = 0,001$) [6].

Корреляционная связь между длиной селезенки и степенью фиброза печени была статистически значимой, прямой, заметной силы ($r_s = 0,686$; $p = 0,010$) [6]. Между Индексом резистентности печеночной артерии и степенью фиброза печени по шкале Десмет была установлена статистически значимая, заметная, прямая корреляционная связь ($r_s = 0,639$ $p = 0,045$) [6]. Более того, установлена значимая корреляционная связь между такими доплерографическими показателями, как: индекс Допа/Двв, ($r_s = 0,683$, $p = 0,047$) прямая, заметная корреляционная связь, а также между диаметром печеночной артерии ($r_s = 0,749$, $p = 0,042$) и индексом склероза по Десмет установлена высокая, прямая корреляционная связь [6].

Учитывая выявленные статистически значимые различия при сравнительном анализе по индексу APRI в двух группах (F0–2 $n = 108$ и F3–4 $n = 58$), нами был проведен ROC-анализ с построением ROC-кривой [6]. При оценке зависимости вероятности выраженности фиброза/цирроза печени от значений индекса APRI была получена следующая ROC-кривая [6] (Рисунок 15).

Полученная ROC-кривая характеризовалась значением AUC, равным $0,792 \pm 0,056$ (95%-й ДИ 0,76–0,88) [6]. Модель была статистически значимой ($p = 0,009$) [6]. Значение индекса APRI в точке cut-off составило 1,52: при индексе APRI выше 1,52 отмечался высокий риск выраженного фиброза/цирроза печени, а при более низких значениях – риск выраженного фиброза/цирроза признавался низким [6]. Чувствительность и специфичность модели при выбранном пороговом значении APRI составляла 73,9% и 71,1% соответственно [6].

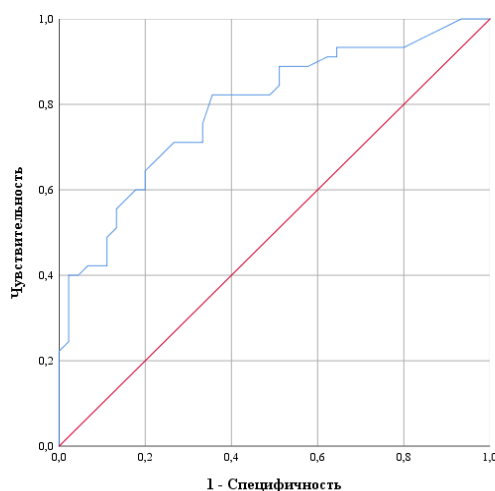


Рисунок 15 – ROC-кривая, характеризующая зависимость вероятности выраженного фиброза/цирроза (F3-4) печени от индекса APRI

Таким образом, согласно нашему исследованию, наиболее информативным биохимическим маркером выраженного фиброза/цирроза печени при БА у детей является индекс APRI, при значениях которого $> 1,52$ отмечался высокий риск выраженного фиброза/цирроза печени (F3-4), чувствительность и специфичность при данном пороговом значении составляет 73,9% и 71,1%, соответственно [6]. Также умеренную значимость при прогрессировании фиброза продемонстрировали показатели АЛТ, АСТ [6]. Прогрессирование ФП и возникающие вследствие этого осложнения в значительной степени определяют выживаемость с нативной печенью у детей с БА [6].

Вместе с тем сроки формирования выраженного фиброза/цирроза печени широко варьируют от нескольких месяцев жизни до взрослого возраста [6]. В связи с этим выявление неинвазивных маркеров позволяет своевременно определить риск развития серьезных осложнений и, в том числе, портальной гипертензии, кровотечений из варикозно-расширенных вен пищевода и показания к проведению ТП [6].

Среди ультразвуковых и доплерографических параметров значимыми в диагностике выраженного фиброза/цирроза печени являются: длина селезенки, индекс резистентности печеночной артерии, индекс $Do_{pa}/D_{вв}$, диаметр печеночной артерии [6].

3.4 Результаты полноэкзомного поиска ассоциаций среди пациентов с билиарной атрезией и анализ влияния молекулярно-генетических маркеров на исход операции Касаи

Всем пациентам проводился поиск значимых вариантов в генах, ассоциированных с моногенными холестатическими заболеваниями печени: *ABCB11, ABCB4, ABCC2, ABCD3, ACOX2, AKR1D1, ALG8, AMACR, ATP8B1, BAAT, BCS1L, CYP7B1, DCDC2, DGUOK, DHCR7, EPHX1, FAH, GALE, GALT, HSD17B4, HSD3B7, JAG1, LARS, LIPA, MARS, MPI, MPV17, MYO5B, NBAS, NOTCH2, NPC1, NPC2, NR1H4, PEX1, PEX10, PEX12, PEX26, PEX6, PEX7, PKHD1, POLG, SERPINA1, SLC25A13, SLCO1B1, SLCO1B3, SMPD1, TALDO1, TJP2, TRMU, UGT1A1, VIPAS39, VPS33B*. Патогенные и, вероятно, патогенные варианты нуклеотидных последовательностей, имеющие возможное отношение к фенотипу, не выявлены, что позволило с высокой вероятностью исключить у данных пациентов наследственные причины поражения печени.

Одновременно с этим проведен полноэкзомный поиск ассоциаций, не связанных с моногенными заболеваниями печени у 66 пациентов с БА в сравнении с 637 здоровыми детьми. По результатам проведения полноэкзомного секвенирования образцов пациентов с БА, среднее значение покрытия целевой области составило 101,37x; среднее значение полноты покрытия 10x целевой области составило 96,05%. При проведении полноэкзомного поиска ассоциаций у 66 пациентов с билиарной атрезией в сравнении с 637 здоровыми были построены аддитивная, доминантная и рецессивная модели наследования (Таблицы 8–10).

Таблица 8 – Список генетических маркеров, продемонстрировавших статистически значимую ассоциацию с диагнозом «билиарная атрезия» при использовании аддитивной модели

Генетический маркер	Хромосома	Позиция в геноме (GRCh37/hg19)	Аллель риска	Значение P_{adj}	Ген
1	2	3	4	5	6
<i>rs368030585</i>	7	142131872	T	2,962e-17	<i>LOC105379749</i>
<i>rs146414302</i>	2	98129670	T	1,781e-16	<i>ANKRD36</i>

Продолжение таблицы 8

<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
<i>rs140511</i>	22	51042513	C	3,698e-16	<i>MAPK8IP2</i>
<i>rs76678169</i>	12	58220872	T	3,911e-16	<i>CTDSP2</i>
<i>rs62431284</i>	6	136582497	T	3,406e-15	<i>BCLAF1</i>
<i>rs77777159</i>	12	11286249	C	1,358e-14	<i>PRH1</i>
<i>rs879081874</i>	4	103826757	C	3,132e-14	<i>SLC9B1</i>
<i>rs201095197</i>	14	107282859	A	3,887e-14	межгенный вариант
<i>rs374575972</i>	7	142131868	T	1,033e-13	<i>LOC105379749</i>
<i>rs968366784</i>	1	117146585	A	1,091e-13	<i>IGSF3</i>
<i>rs201336503</i>	14	107282852	C	1,635e-13	межгенный вариант
<i>rs375776693</i>	16	74425787	T	1,996e-13	<i>NPIPB15</i>
<i>rs79728621</i>	11	1017933	G	3,487e-13	<i>MUC6</i>
<i>rs1308693425</i>	7	142120003	C	3,605e-13	<i>LOC105379749</i>
<i>rs78691025</i>	12	58220809	C	4,23e-13	<i>CTDSP2</i>
<i>rs75577125</i>	19	1037791	T	1,191e-12	<i>CNN2</i>
<i>rs755747181</i>	15	23686062	C	4,212e-12	<i>GOLGA6L2</i>
<i>rs1237920116</i>	7	142120005	G	4,495e-12	<i>LOC105379749</i>
<i>rs764528462</i>	7	142223951	T	7,719e-12	межгенный вариант
<i>rs2772061</i>	1	206579936	G	9,205e-12	<i>SRGAP2D</i>
<i>rs1258020190</i>	7	142223953	C	9,736e-12	межгенный вариант
<i>rs776089634</i>	7	142223949	G	1,152e-11	межгенный вариант
<i>rs5827939</i>	19	36258937	AG	1,291e-11	<i>PROSER3</i>
<i>rs774802249</i>	7	142223952	T	1,892e-11	межгенный вариант
<i>rs4024420</i>	7	151935853	C	3,215e-11	<i>KMT2C</i>
<i>rs144845866</i>	9	33798079	C	3,328e-11	<i>PRSS3</i>
<i>rs78773460</i>	10	29783908	G	4,616e-11	<i>SVIL</i>
<i>rs1050917</i>	1	40235489	C	8,05e-11	<i>BMP8B</i>
<i>rs73403301</i>	11	1018523	G	8,649e-11	<i>MUC6</i>
<i>rs78797154</i>	19	1037801	C	1,161e-10	<i>CNN2</i>
<i>rs75676484</i>	19	1037781	A	1,191e-10	<i>CNN2</i>
<i>rs3958533</i>	2	129026227	T	1,634e-10	<i>HS6ST1</i>
<i>rs7252604</i>	19	22363844	A	1,702e-10	<i>ZNF676</i>
<i>rs77563894</i>	16	74425732	T	4,004e-10	<i>NPIPB15</i>
<i>rs62157473</i>	2	113147159	A	7,46e-10	<i>RGPD8</i>

Продолжение таблицы 8

<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
<i>rs1175263485</i>	19	8993036	T	3,923e-09	<i>MUC16</i>
<i>нет rsID</i>	23	51239293	T	4,986e-09	<i>NUDT11</i>
<i>rs4845747</i>	1	152186766	A	8,786e-09	<i>HRNR</i>
<i>rs62513920</i>	8	101718932	G	9,45e-09	<i>PABPC1</i>
<i>rs199741851</i>	19	1037718	T	1,274e-08	<i>CNN2</i>
<i>rs867003392</i>	20	21186161	A	1,371e-08	<i>KIZ-AS1</i>
<i>rs201589859</i>	2	131221445	G	2,093e-08	<i>POTE1</i>
<i>rs73172125</i>	13	25021323	G	7,175e-08	<i>PARP4</i>
<i>rs61503212</i>	8	10467605	T	2,107e-07	<i>RPIL1</i>
<i>rs377425677</i>	7	45123925	T	2,255e-07	<i>NACAD</i>
<i>rs62077279</i>	17	45266522	C	2,655e-07	<i>CDC27</i>
<i>rs55912941</i>	11	125452300	A	4,376e-07	<i>STT3A-AS1</i>
<i>rs201982103</i>	11	56143810	C	5,323e-07	<i>OR8U8</i>
<i>rs80214016</i>	3	75786687	T	7,716e-07	<i>ZNF717</i>
<i>rs200315308</i>	10	37433975	G	9,857e-07	<i>ANKRD30A</i>
<i>rs202130567</i>	9	69423821	T	1,076e-06	<i>ANKRD20A4- ANKRD20A20P</i>
<i>rs78251590</i>	19	1037871	A	1,168e-06	<i>CNN2</i>
<i>rs112630759</i>	3	75786483	A	1,932e-06	<i>ZNF717</i>
<i>rs370627469</i>	3	75786430	T	2,468e-06	<i>ZNF717</i>
<i>rs2320230</i>	17	39340852	G	4,91e-06	<i>KRTAP4-1</i>
<i>rs199523896</i>	12	8074055	C	1,894e-05	<i>SLC2A3</i>
<i>rs35856253</i>	13	23251016	CT	3,198e-05	межгенный вариант
<i>rs78729591</i>	11	56143795	A	5,911e-05	<i>OR8U8</i>
<i>rs5862681</i>	4	144938033	A	6,018e-05	<i>GYPB</i>
<i>rs76325618</i>	11	56143784	A	6,453e-05	<i>OR8U8</i>
<i>rs11436139</i>	11	67795378	G	6,51e-05	<i>ALDH3B1</i>
<i>rs201532581</i>	19	1037716	A	9,233e-05	<i>CNN2</i>
<i>rs1042446</i>	5	256514	C	9,708e-05	<i>SDHA</i>
<i>rs201935302</i>	12	11506785	T	0,0001318	<i>PRB1</i>
<i>rs62513922</i>	8	101718968	T	0,0001721	<i>PABPC1</i>
<i>rs78143867</i>	11	56143785	G	0,0002646	<i>OR8U8</i>
<i>rs62513923</i>	8	101718987	A	0,0002916	<i>PABPC1</i>
<i>rs62513921</i>	8	101718965	A	0,0003256	<i>PABPC1</i>

Продолжение таблицы 8

<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
<i>rs78531059</i>	11	56143786	C	0,0005087	<i>OR8U8</i>
<i>rs111846092</i>	12	11243960	T	0,0005148	<i>PRH1</i>
<i>rs372620668</i>	12	11506647	C	0,0007414	<i>PRB1</i>
<i>rs779730622</i>	7	142168835	T	0,0009494	<i>LOC107986855</i>
<i>rs5883174</i>	7	28997596	G	0,001033	<i>TRIL</i>
<i>rs74442958</i>	10	126686605	T	0,00186	<i>CTBP2</i>
<i>rs65051</i>	1	12854356	C	0,003295	<i>PRAMEF1</i>
<i>rs199748333</i>	3	195506099	C	0,003733	<i>MUC4</i>
<i>rs200882406</i>	3	195507675	C	0,005485	<i>MUC4</i>
<i>rs6526</i>	1	39977575	C	0,009386	<i>BMP8A</i>
<i>rs8010994</i>	14	70924501	C	0,01011	<i>ADAM21</i>
<i>rs77251052</i>	3	75786031	C	0,01014	<i>ZNF717</i>
<i>rs577355457</i>	6	109850200	A	0,01074	<i>AK9</i>
<i>rs374978025</i>	7	142168836	G	0,01501	<i>LOC107986855</i>
<i>rs202036213</i>	22	23241753	TA	0,01778	межгенный вариант
<i>rs4959084</i>	6	31976926	T	0,02022	<i>CYP21A1P</i>
<i>rs1262902283</i>	12	40882586	A	0,02058	<i>MUC19</i>
<i>rs796159102</i>	10	126686680	C	0,02242	<i>CTBP2</i>
<i>rs587660734</i>	1	148756648	C	0,02524	<i>NBPF25P</i>
<i>rs35575803</i>	19	20807177	G	0,02579	<i>ZNF626</i>
<i>rs75603622</i>	2	95542419	A	0,0273	<i>LOC442028</i>
<i>rs9269957</i>	6	32552141	A	0,04112	<i>HLA-DRB1</i>
<i>rs76634974</i>	3	75786403	T	0,04121	<i>ZNF717</i>
<i>rs1136756</i>	6	32552134	G	0,04137	<i>HLA-DRB1</i>
<i>rs77304443</i>	3	75786387	C	0,04629	<i>ZNF717</i>
<i>rs9269956</i>	6	32552139	G	0,04794	<i>HLA-DRB1</i>

Таблица 9 – Список генетических маркеров, продемонстрировавших статистически значимую ассоциацию с диагнозом «билиарная атрезия» при использовании доминантной модели

<i>Генетический маркер</i>	<i>Хромосома</i>	<i>Позиция в геноме (GRCh37/hg19)</i>	<i>Аллель риска</i>	<i>Значение P_{adj}</i>	<i>Ген</i>
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
<i>rs368030585</i>	7	142131872	T	2,962e-17	<i>LOC105379749</i>
<i>rs146414302</i>	2	98129670	T	1,781e-16	<i>ANKRD36</i>

Продолжение таблицы 9

1	2	3	4	5	6
<i>rs140511</i>	22	51042513	C	3,698e-16	<i>MAPK8IP2</i>
<i>rs76678169</i>	12	58220872	T	3,911e-16	<i>CTDSP2</i>
<i>rs62431284</i>	6	136582497	T	3,406e-15	<i>BCLAF1</i>
<i>rs77777159</i>	12	11286249	C	1,358e-14	<i>PRHI</i>
<i>rs879081874</i>	4	103826757	C	3,131e-14	<i>SLC9B1</i>
<i>rs201095197</i>	14	107282859	A	3,887e-14	межгенный вариант
<i>rs374575972</i>	7	142131868	T	1,033e-13	<i>LOC105379749</i>
<i>rs968366784</i>	1	117146585	A	1,091e-13	<i>IGSF3</i>
<i>rs201336503</i>	14	107282852	C	1,635e-13	межгенный вариант
<i>rs375776693</i>	16	74425787	T	1,996e-13	<i>NPIPBI5</i>
<i>rs79728621</i>	11	1017933	G	3,487e-13	<i>MUC6</i>
<i>rs1308693425</i>	7	142120003	C	3,605e-13	<i>LOC105379749</i>
<i>rs78691025</i>	12	58220809	C	4,23e-13	<i>CTDSP2</i>
<i>rs75577125</i>	19	1037791	T	1,191e-12	<i>CNN2</i>
<i>rs755747181</i>	15	23686062	C	4,212e-12	<i>GOLGA6L2</i>
<i>rs1237920116</i>	7	142120005	G	4,495e-12	<i>LOC105379749</i>
<i>rs764528462</i>	7	142223951	T	7,718e-12	межгенный вариант
<i>rs2772061</i>	1	206579936	G	9,205e-12	<i>SRGAP2D</i>
<i>rs1258020190</i>	7	142223953	C	9,736e-12	межгенный вариант
<i>rs776089634</i>	7	142223949	G	1,152e-11	межгенный вариант
<i>rs5827939</i>	19	36258937	AG	1,291e-11	<i>PROSER3</i>
<i>rs774802249</i>	7	142223952	T	1,892e-11	межгенный вариант
<i>rs4024420</i>	7	151935853	C	3,215e-11	<i>KMT2C</i>
<i>rs144845866</i>	9	33798079	C	3,327e-11	<i>PRSS3</i>
<i>rs78773460</i>	10	29783908	G	4,616e-11	<i>SVIL</i>
<i>rs73403301</i>	11	1018523	G	8,648e-11	<i>MUC6</i>
<i>rs1050917</i>	1	40235489	C	1,1e-10	<i>BMP8B</i>
<i>rs78797154</i>	19	1037801	C	1,161e-10	<i>CNN2</i>
<i>rs75676484</i>	19	1037781	A	1,191e-10	<i>CNN2</i>
<i>rs3958533</i>	2	129026227	T	1,634e-10	<i>HS6ST1</i>
<i>rs7252604</i>	19	22363844	A	1,702e-10	<i>ZNF676</i>
<i>rs77563894</i>	16	74425732	T	4,004e-10	<i>NPIPBI5</i>
<i>rs62157473</i>	2	113147159	A	7,459e-10	<i>RGPD8</i>

Продолжение таблицы 9

1	2	3	4	5	6
<i>rs1175263485</i>	19	8993036	T	3,923e-09	<i>MUC16</i>
<i>rs4845747</i>	1	152186766	A	8,786e-09	<i>HRNR</i>
<i>rs62513920</i>	8	101718932	G	9,45e-09	<i>PABPC1</i>
<i>rs199741851</i>	19	1037718	T	1,274e-08	<i>CNN2</i>
<i>rs867003392</i>	20	21186161	A	1,371e-08	<i>KIZ-AS1</i>
<i>rs61503212</i>	8	10467605	T	5,925e-08	<i>RPIL1</i>
<i>rs73172125</i>	13	25021323	G	7,174e-08	<i>PARP4</i>
<i>rs377425677</i>	7	45123925	T	2,255e-07	<i>NACAD</i>
<i>rs62077279</i>	17	45266522	C	2,655e-07	<i>CDC27</i>
<i>rs201982103</i>	11	56143810	C	5,323e-07	<i>OR8U8</i>
<i>rs80214016</i>	3	75786687	T	7,716e-07	<i>ZNF717</i>
<i>rs200315308</i>	10	37433975	G	9,856e-07	<i>ANKRD30A</i>
<i>rs78251590</i>	19	1037871	A	1,168e-06	<i>CNN2</i>
<i>rs2320230</i>	17	39340852	G	1,699e-06	<i>KRTAP4-1</i>
<i>rs112630759</i>	3	75786483	A	1,932e-06	<i>ZNF717</i>
<i>rs370627469</i>	3	75786430	T	2,468e-06	<i>ZNF717</i>
<i>rs111846092</i>	12	11243960	T	4,518e-06	<i>PRH1</i>
<i>rs587660734</i>	1	148756648	C	6,278e-06	<i>NBPF25P</i>
<i>rs55912941</i>	11	125452300	A	6,499e-06	<i>STT3A-AS1</i>
<i>rs202130567</i>	9	69423821	T	7,125e-06	<i>ANKRD20A4- ANKRD20A20P</i>
<i>rs199523896</i>	12	8074055	C	1,894e-05	<i>SLC2A3</i>
<i>rs35856253</i>	13	23251016	CT	2,353e-05	межгенный вариант
<i>rs78729591</i>	11	56143795	A	5,911e-05	<i>OR8U8</i>
<i>rs76325618</i>	11	56143784	A	6,453e-05	<i>OR8U8</i>
<i>rs201935302</i>	12	11506785	T	7,453e-05	<i>PRB1</i>
<i>rs201532581</i>	19	1037716	A	9,233e-05	<i>CNN2</i>
<i>rs1042446</i>	5	256514	C	9,707e-05	<i>SDHA</i>
<i>rs62513922</i>	8	101718968	T	0,0001721	<i>PABPC1</i>
<i>rs78143867</i>	11	56143785	G	0,0002646	<i>OR8U8</i>
<i>rs62513923</i>	8	101718987	A	0,0002916	<i>PABPC1</i>
<i>rs62513921</i>	8	101718965	A	0,0003256	<i>PABPC1</i>
<i>rs78531059</i>	11	56143786	C	0,0005087	<i>OR8U8</i>
<i>rs372620668</i>	12	11506647	C	0,0007414	<i>PRB1</i>

Продолжение таблицы 9

<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
<i>rs202036213</i>	22	23241753	TA	0,0008377	межгенный вариант
<i>rs779730622</i>	7	142168835	T	0,0009494	<i>LOC107986855</i>
<i>rs5883174</i>	7	28997596	G	0,001033	<i>TRIL</i>
<i>rs4959084</i>	6	31976926	T	0,001092	<i>CYP21A1P</i>
<i>rs11436139</i>	11	67795378	G	0,001116	<i>ALDH3B1</i>
<i>rs577355457</i>	6	109850200	A	0,001397	<i>AK9</i>
<i>rs74442958</i>	10	126686605	T	0,00186	<i>CTBP2</i>
<i>rs61775051</i>	1	12854356	C	0,003295	<i>PRAMEF1</i>
<i>rs200882406</i>	3	195507675	C	0,005484	<i>MUC4</i>
<i>rs9269957</i>	6	32552141	A	0,005671	<i>HLA-DRB1</i>
<i>rs1136756</i>	6	32552134	G	0,00571	<i>HLA-DRB1</i>
<i>rs200751227</i>	3	195514948	A	0,005907	<i>MUC4</i>
<i>rs9269956</i>	6	32552139	G	0,006832	<i>HLA-DRB1</i>
<i>rs35575803</i>	19	20807177	G	0,007256	<i>ZNF626</i>
<i>rs8010994</i>	14	70924501	C	0,007933	<i>ADAM21</i>
<i>rs11355796</i>	3	130190720	AT	0,008653	<i>COL6A5</i>
<i>rs77251052</i>	3	75786031	C	0,01014	<i>ZNF717</i>
<i>rs374978025</i>	7	142168836	G	0,01501	<i>LOC107986855</i>
<i>rs448740</i>	1	161599693	T	0,01788	<i>FCGR3B</i>
<i>rs796159102</i>	10	126686680	C	0,02242	<i>CTBP2</i>
<i>rs199748333</i>	3	195506099	C	0,02327	<i>MUC4</i>
<i>rs75603622</i>	2	95542419	A	0,02729	<i>LOC442028</i>
<i>rs200161977</i>	3	195505932	C	0,04008	<i>MUC4</i>
<i>rs61947037</i>	13	25021154	T	0,0402	<i>PARP4</i>
<i>rs76634974</i>	3	75786403	T	0,0412	<i>ZNF717</i>
<i>rs77304443</i>	3	75786387	C	0,04629	<i>ZNF717</i>

Таблица 10 – Список генетических маркеров, продемонстрировавших статистически значимую ассоциацию с диагнозом «билиарная атрезия» при использовании рецессивной модели

<i>Генетический маркер</i>	<i>Хромосома</i>	<i>Позиция в геноме (GRCh37/hg19)</i>	<i>Аллель риска</i>	<i>Значение P_{adj}</i>	<i>Ген</i>
<i>rs201589859</i>	2	131221445	G	6,91e-15	<i>POTE1</i>
<i>rs6526</i>	1	39977575	C	8,92e-10	<i>BMP8A</i>

Продолжение таблицы 10

Генетический маркер	Хромосома	Позиция в геноме (GRCh37/hg19)	Аллель риска	Значение P_{adj}	Ген
<i>rs5862681</i>	4	144938033	A	0,0001131	<i>GYPB</i>
<i>rs227789</i>	17	3324004	C	0,0002637	<i>OR3A3</i>
<i>rs201587814</i>	19	54726630	T	0,0005408	<i>LILRB3</i>
<i>rs3736759</i>	14	50623657	G	0,01274	<i>SOS2</i>
<i>rs3736761</i>	14	50623683	A	0,01865	<i>SOS2</i>

Анализ функциональной активности с использованием ресурсов Gene Ontology (GO) и KEGG применялся для определения наиболее значимых генных сетей и клеточных процессов, в которых задействованы ранее идентифицированные гены-маркеры, обнаруженные в ходе проведения EWAS, (Рисунки 16–18).

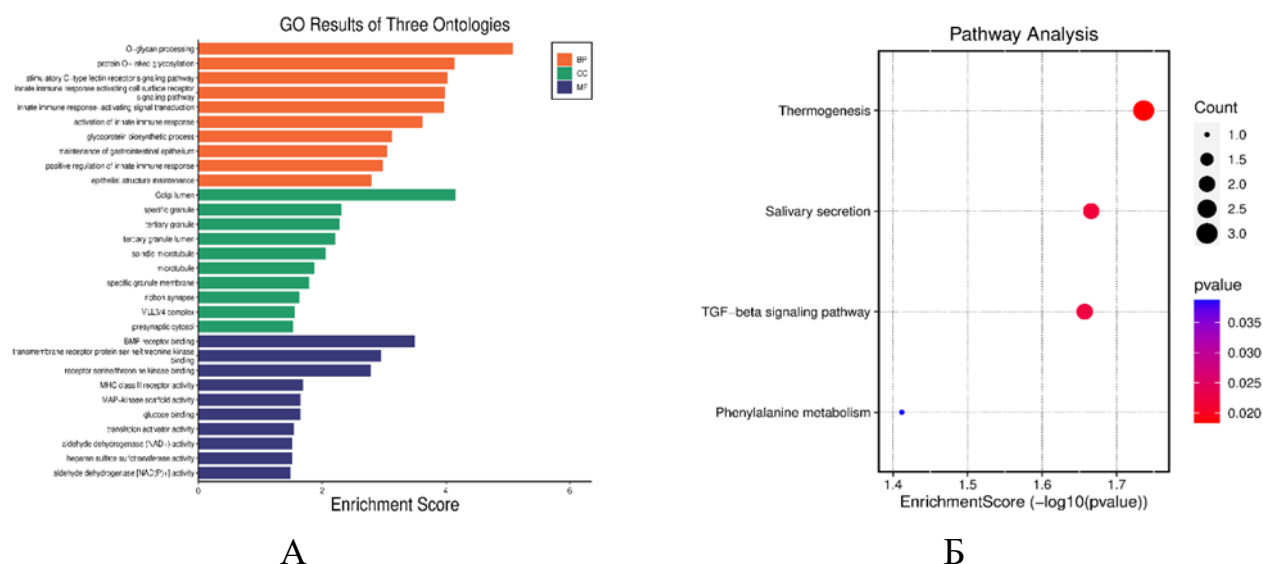


Рисунок 16 – Диаграммы GO (А) и KEGG (Б), построенные на основании анализа списка маркеров, продемонстрировавших статистически значимую ассоциацию с диагнозом «билиарная атрезия» при использовании аддитивной модели

Наиболее значимые категории генных онтологий для биологических процессов как аддитивной, так и доминантной моделями были связаны с иммунной системой. Гены участвовали в активации сигнального пути рецепторов лектинов типа С (GO:0002223). В пути дегрануляции нейтрофилов (GO:0043312) были представлены гены *CNN2*, *PRSS3*, *HRNR*, *SLC2A3*, *ALDH3B1*, *FCGR3B* (последний был только в доминантной модели). Также ряд генов был задействован в поддержании структуры эпителия желудочно-кишечного тракта (GO:0030277).

Функциональный анализ на основе данных KEGG обнаружил высокий уровень обогащения у факторов секреции слюнных желез (hsa04970).

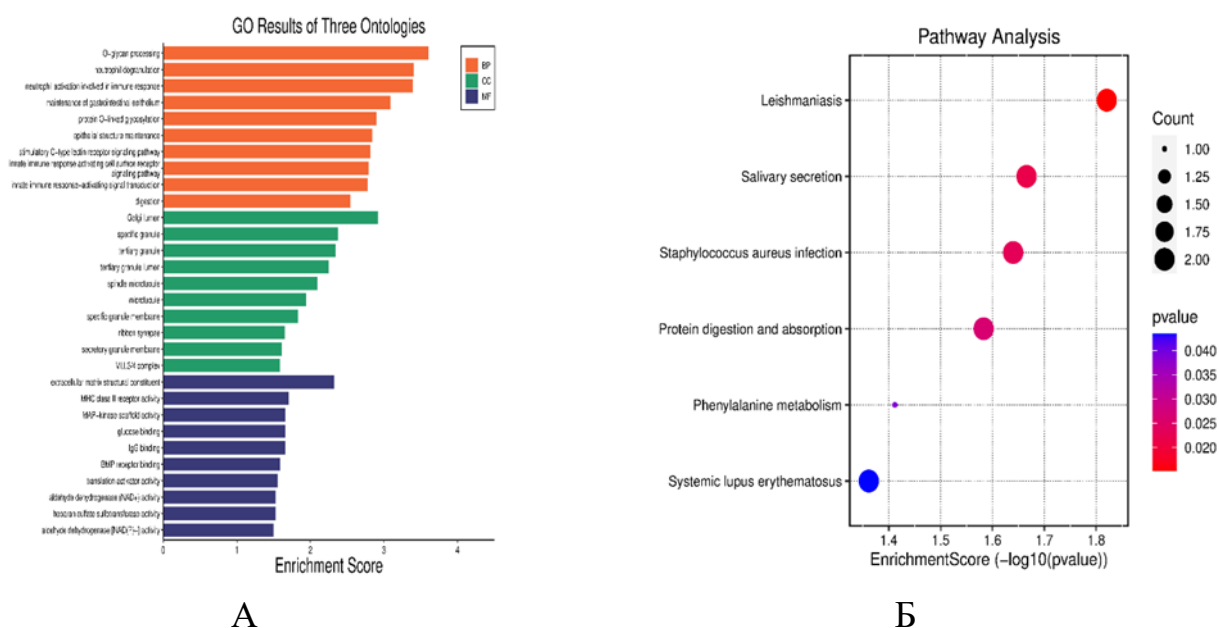


Рисунок 17 – Диаграммы GO (А) и KEGG (Б), построенные на основании анализа списка маркеров, продемонстрировавших статистически значимую ассоциацию с диагнозом «билиарная атрезия» при использовании доминантной модели

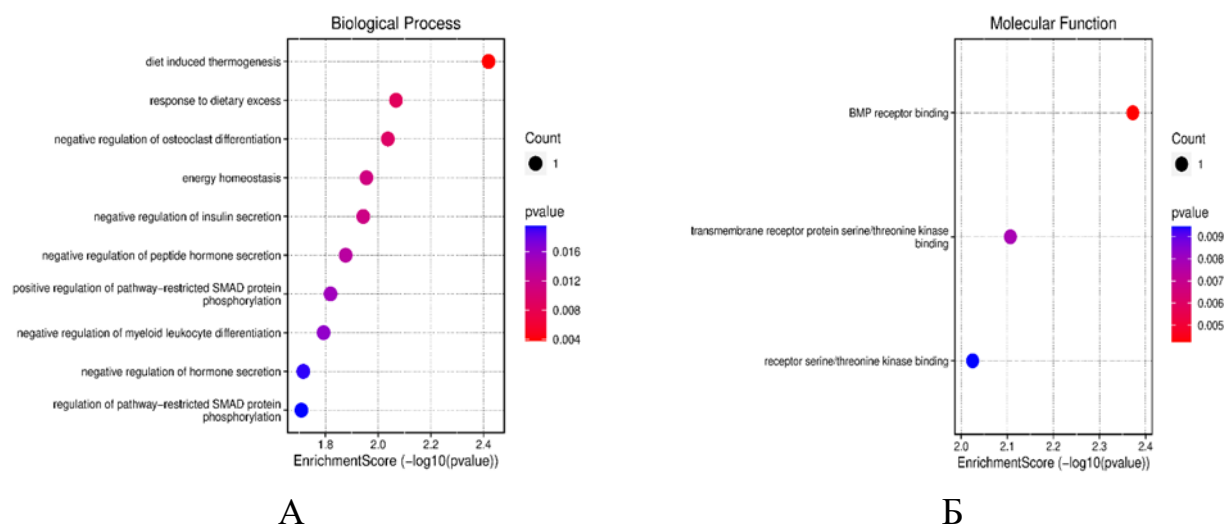


Рисунок 18 – Диаграммы GO (А) и KEGG (Б), построенные на основании анализа списка маркеров, продемонстрировавших статистически значимую ассоциацию с диагнозом «билиарная атрезия» при использовании рецессивной модели

Гены *LILRB3* и *SOS2* были выявлены только в рецессивной модели. Первый связан с такими путями, как «Иммунорегуляторные взаимодействия между лимфоидными и не лимфоидными клетками (R-HSA-198933)» и «Дегрануляция нейтрофилов (R-HSA-6798695)», а второй – с путями «Сигналинг интерлейкина 15 (R-HSA-8983432)» и «Сигналинг семейства интерлейкинов 2 (R-HSA-451927)».

Таким образом, на основании проведенного нами исследования были выявлены варианты генов, ассоциированных с развитием билиарной атрезии, обнаружение которых может свидетельствовать о высокой вероятности развития заболевания. Одним из ключевых звеньев в этиопатогенезе БА отведено иммунорегуляторным механизмам, так как БА – это фибровоспалительное заболевание, для которого характерна инфильтрация воспалительными клетками, избыточная экспрессия цитокинов и/или хемокинов при морфологическом исследовании биоптатов печени больных [1]. В нашем исследовании выявлены варианты, ответственные за функциональную активность иммунной системы, что позволяет рассматривать патологию иммунорегуляторных механизмов в генезе БА.

Анализ влияния молекулярно-генетических маркеров на исход операции Касаи

По критерию «эффективность операции Касаи» выборка пациентов с диагнозом БА была разделена на две когорты («эффективная операция» и «неэффективная операция»), для каждой из которых, в свою очередь, были проведены EWAS с использованием 637 здоровых образцов. Были построены аддитивная, доминантная и рецессивная модели наследования (Таблицы 11–15).

Таблица 11 – Список генетических маркеров, продемонстрировавших статистически значимую ассоциацию с критерием «эффективная операция» при использовании аддитивной модели

<i>Генетический маркер</i>	<i>Хромосома</i>	<i>Позиция в геноме (GRCh37/hg19)</i>	<i>Аллель риска</i>	<i>Значение P_{adj}</i>	<i>Ген</i>
<i>rs200315308</i>	10	37433975	G	0,0002122	<i>ANKRD30A</i>
<i>rs112630759</i>	3	75786483	A	0,0003416	<i>ZNF717</i>
<i>rs370627469</i>	3	75786430	T	0,0003952	<i>ZNF717</i>
<i>rs80214016</i>	3	75786687	T	0,0005148	<i>ZNF717</i>
<i>rs1042446</i>	5	256514	C	0,001126	<i>SDHA</i>

Продолжение таблицы 11

<i>Генетический маркер</i>	<i>Хромосома</i>	<i>Позиция в геноме (GRCh37/hg19)</i>	<i>Аллель риска</i>	<i>Значение P_{adj}</i>	<i>Ген</i>
<i>rs77304443</i>	3	75786387	C	0,003091	<i>ZNF717</i>
<i>rs11436139</i>	11	67795378	G	0,006074	<i>ALDH3B1</i>
<i>rs77251052</i>	3	75786031	C	0,006084	<i>ZNF717</i>
<i>rs199523896</i>	12	8074055	C	0,01027	<i>SLC2A3</i>
<i>rs76634974</i>	3	75786403	T	0,01505	<i>ZNF717</i>
<i>rs76325618</i>	11	56143784	A	0,01797	<i>OR8U1</i>
<i>rs201935302</i>	12	11506785	T	0,02515	<i>PRB1</i>
<i>rs75603622</i>	2	95542419	A	0,02702	<i>TEKT4</i>
<i>rs796159102</i>	10	126686680	C	0,0399	<i>CTBP2</i>
<i>rs74442958</i>	10	126686605	T	0,04014	<i>CTBP2</i>
<i>rs77511709</i>	3	75786415	T	0,02082	<i>ZNF717</i>
<i>rs77110441</i>	3	75786251	A	0,03707	<i>ZNF717</i>
<i>rs28723506</i>	16	88495367	A	0,04606	<i>ZNF469</i>

Таблица 12 – Список генетических маркеров, продемонстрировавших статистически значимую ассоциацию с критерием «неэффективная операция» при использовании аддитивной модели

<i>Генетический маркер</i>	<i>Хромосома</i>	<i>Позиция в геноме (GRCh37/hg19)</i>	<i>Аллель риска</i>	<i>Значение P_{adj}</i>	<i>Ген</i>
<i>rs5862681</i>	4	144938033	A	0,000578	<i>GYPB</i>
<i>rs62513923</i>	8	101718987	A	0,001652	<i>PABPC1</i>
<i>rs62513922</i>	8	101718968	T	0,005736	<i>PABPC1</i>
<i>rs62513921</i>	8	101718965	A	0,007698	<i>PABPC1</i>
<i>rs35856253</i>	13	23251016	CT	0,009534	межгенный вариант
<i>rs201532581</i>	19	1037716	A	0,01397	<i>CNN2</i>
<i>rs6526</i>	1	39977575	C	0,03089	<i>BMP8A</i>
<i>rs61775051</i>	1	12854356	C	0,0341	<i>PRAMEF1</i>
<i>rs78729591</i>	11	56143795	A	0,03975	<i>OR8U1</i>
<i>rs2469826</i>	17	38938591	G	0,0172	<i>KRT27</i>

Таблица 13 – Список генетических маркеров, продемонстрировавших статистически значимую ассоциацию с критерием «эффективная операция» при использовании доминантной модели

Генетический маркер	Хромосома	Позиция (GRCh37/hg19)	Аллель риска	P_{adj}	Ген
rs200315308	10	37433975	G	0,000225	ANKRD30A
rs112630759	3	75786483	A	0,0003509	ZNF717
rs370627469	3	75786430	T	0,0004055	ZNF717
rs80214016	3	75786687	T	0,0005412	ZNF717
rs1042446	5	256514	C	0,001181	SDHA
rs2320230	17	39340852	G	0,002818	KRTAP4-1
rs77304443	3	75786387	C	0,003217	ZNF717
rs77251052	3	75786031	C	0,006543	ZNF717
rs199523896	12	8074055	C	0,01102	SLC2A3
rs587660734	1	148756648	C	0,01379	NBPF25P
rs76634974	3	75786403	T	0,01583	ZNF717
rs76325618	11	56143784	A	0,01888	OR8U1
rs11436139	11	67795378	G	0,01964	ALDH3B1
rs201935302	12	11506785	T	0,01985	PRB1
rs77511709	3	75786415	T	0,02107	ZNF717
rs75603622	2	95542419	A	0,02786	TEKT4
rs77110441	3	75786251	A	0,03821	ZNF717
rs796159102	10	126686680	C	0,04109	CTBP2
rs74442958	10	126686605	T	0,04132	CTBP2

Таблица 14 – Список генетических маркеров, продемонстрировавших статистически значимую ассоциацию с критерием «неэффективная операция» при использовании доминантной модели

Генетический маркер	Хромосома	Позиция (GRCh37/hg19)	Аллель риска	P_{adj}	Ген
rs62513923	8	101718987	A	0,001822	PABPC1
rs62513922	8	101718968	T	0,006235	PABPC1
rs62513921	8	101718965	A	0,008517	PABPC1
rs61775051	1	12854356	C	0,03925	PRAMEF1

Таблица 15 – Список генетических маркеров, продемонстрировавших статистически значимую ассоциацию с критерием «неэффективная операция» при использовании рецессивной модели

Генетический маркер	Хромосома	Позиция (GRCh37/hg19)	Аллель риска	P_{adj}	Ген
rs2599972	2	130899804	T	0,02058	CCDC74B

Также были обнаружены варианты, которые присутствовали только у одной группы пациентов (группы «эффективная операция» и «неэффективная операция»).

Для пациентов, у которых операция Касаи имела успех, наиболее значимые категории генных онтологий для молекулярных функций и клеточных компонентов как аддитивной, так и доминантной моделей были представлены путями «мембраны секреторных везикул гранулоцитов» (GO:0035579) и «связывание глюкозы» (GO:0005536). В доминантной модели самые обогащённые пути биологических процессов были связаны с регуляцией иммунного ответа, в аддитивной – отвечающие за образование комплекса между мембраной везикулы и пресинаптической мембраной (GO:0016081), а также метаболические пути L-аскорбиновой кислоты (GO:0019852). Функциональный анализ на основе данных KEGG обнаружил высокий уровень обогащения у факторов метаболизма фенилаланина (hsa00360) и гистидина (hsa00340) в обеих моделях. Только в доминантной модели был представлен ген *HLA-DRB1*. Рецессивная модель не выявила вариантов, которые присутствовали бы исключительно у пациентов, успешно перенёсших операцию Касаи.

Пациентам, которым не помогла операция Касаи, доминантная модель определила два гена: *PABPC1*, *PRAMEF1*. *PABPC1* вызывает деаденилирование мРНК (R-HSA-429947). Ген *PRAMEF1* мало описан, предполагается, что он участвует в онкологических процессах и связывании с ядерным рецептором ретиноевой кислоты (GO:0042974). В аддитивной модели ген *PABPC1* также высоко обогащает пути деаденилирования мРНК. Помимо этого, значимыми путями являются: прикрепление клетки к внеклеточному матриксу (GO:0005925) и связывание рецепторов, обладающих серин-треонин киназной активностью

(GO:0033612). Ген *CNN2* включен в сигнальный путь ИЛ-12 (R-HSA-9020591). В рецессивной модели был представлен единственный ген *CCDC74B*, ассоциированный с краниоэктодермальной дисплазией и участвующий в связывании белков (GO:0005515).

Таким образом, нами выявлены варианты в генах, на основании которых можно предполагать исход хирургического лечения детей с билиарной атрезией. Основная роль в определении эффективности операции Касаи принадлежала сигнальным путям, регулирующим иммунный ответ, а также сигнальным путям, вовлеченным во взаимодействие клеток с внеклеточным матриксом.

3.5 Прогностическая модель эффективности лечения и выживаемости с нативной печенью у детей с билиарной атрезией

В ходе ретроспективного и проспективного анализа, проведенного в период с сентября 2002 года по декабрь 2021 год, были изучены данные 166 детей с БА (93 девочки и 72 мальчика) после операции Касаи. 147 (89%) родились доношенными с массой тела – 3,290 (0,447) кг и 19 (11%) родились недоношенными на 33–36-й неделе с массой тела – 2,293 (0,343) кг.

В нашем исследовании у 5/166 пациентов (3%) была кистозная форма БА, у 4/166 (2,4%) пациентов – синдром билиарной атрезии и мальформации селезенки (BASM), остальные 157/166 (94,5%) детей имели БА III типа. В настоящем исследовании у 2 пациентов с синдромом BASM ПЭ была успешной, несмотря на то что, по данным литературы BASM, синдром описан как прогностически неблагоприятный. Эти пациенты не были исключены из исследования.

Все исследуемые, в зависимости от эффективности операции Касаи, были разделены на 2 группы. Критериями эффективности явились: появление окрашенного стула, купирование желтухи и снижение уровня общего билирубина < 34 ммоль/л в течение 3–6 месяцев после операции.

Операция Касаи была эффективна у 69/166 (42%) пациентов, в то время как у 97/166 (58%) детей оказалась неэффективной. В группе с эффективной ПЭ окрашенный стул у всех детей появился на 2 (0; 3) сутки после операции. В группе с неэффективной окрашенный стул был только у 57/97 (59%) детей на 3-и (2; 4) сутки после операции. При эффективности операции Касаи снижение уровня общего билирубина до 34 ммоль/л было достигнуто на 29-е (16; 64) сутки после операции.

При проведении сравнительного анализа клинико-лабораторных и ультразвуковых данных до проведения операции Касаи между 2 группами статистически значимые различия были выявлены по уровню холестерина до операции ($p = 0,018$), Таблица 16.

Таблица 16 – Сравнительный анализ анамнестических и клинико-лабораторных данных до проведения операции Касаи в исследуемых группах

Параметры	Операция Касаи		P
	эффективна	неэффективна	
	Me [Q1; Q3]	Me [Q1; Q3]	
Количество пациентов	69	97	
1	2	3	4
Масса при рождении, гр	3,235 [2,800; 3,492]	3,372 [3,031; 3,610]	0,158
Возраст на момент операции, дни	80 [61; 94]	77 [65; 92]	0,777
Масса на момент операции, гр	4836 [4215; 5480]	4800 [4275; 5276]	0,801
Длина на момент операции, см	59,0 [57,0; 60,6]	59,0 [55,0; 60,5]	0,992
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	377 [284,5; 549]	400 [307; 538,5]	0,900
Альбумин, г/л	39 [36,8; 41,0]	40,1 [37,0; 42,2]	0,174
ХЭ, Ед/л	6423 [5756; 7211]	6642 [4906; 7189]	0,787
ГГТ, Ед/л	555,5 [329,3; 719,9]	582,5 [409,4; 967,0]	0,251
ХС, ммоль/л	5,34 [4,03; 6,45]	6,29 [4,93; 7,51]	0,018*
ЩФ, Ед/л	511,0 [375,0; 621,2]	561,5 [424,5; 804,3]	0,057
Билирубин общий, мкмоль/л	147,8 [118,7; 171,9]	149,4 [132,4; 189,2]	0,224
Билирубин прямой, мкмоль/л	86,8 [70,0; 105,7]	91,0 [81,6; 119,7]	0,086
АЛТ, Ед/л	159,0 [88,2; 236,0]	151,0 [88,0; 267,0]	0,650

Продолжение таблицы 16

1	2	3	4
АСТ, Ед/л	228,0 [157,8; 316,9]	217,0 [153,0; 389,0]	0,559
Фибриноген, г/л	2,4 [2,0; 2,7]	2,4 [1,9; 2,7]	0,555
МНО	1,06 [0,98; 1,10]	1,04 [0,94; 1,11]	0,477
ТВ, сек	19,0 [17,0; 20,7]	18,5 [17,3; 20,6]	0,723
ПТИ, %	97,1 [86,2; 109,0]	94,4 [86,7; 111,0]	0,978
APRI	1,49 [0,88; 2,22]	1,40 [0,74; 2,20]	0,935
Р-ры печени: п/п линия, см	4,0 [3,0; 4,5]	4,0 [3,0; 5,5]	0,23
Р-ры печени: среднеключичная линия, см	3,0 [2,8; 4,0]	4 [3,0; 4,0]	0,29
Р-ры селезенки, см	2,0 [0,5; 3,0]	1,0 [0; 3,0]	0,15
<i>Примечание – * – различия показателей статистически значимы (p < 0,05)</i>			

Проведенный анализ продемонстрировал, что уровень холестерина в группе с эффективной операцией был статистически значимо ниже, чем в группе с неэффективной операцией Касаи. Наряду с этим была выявлена тенденция в значимости по уровню ЩФ ($p = 0,057$) и прямого билирубина ($p = 0,086$). В группе эффективной ПЭ данные параметры были ниже.

При анализе частоты эффективности операции Касаи в зависимости от ультразвуковых параметров до операции установлено, что частота эффективности ПЭ статистически значимо выше, при визуализации ЖП по данным УЗИ ($p = 0,006$), Таблица 17.

При сравнении частоты эффективности ПЭ в зависимости от остальных факторов, статистически значимых различий не выявлено (Таблица 18).

При сравнении частоты эффективности операции Касаи в зависимости от выраженности фиброза по шкале Десмет у исследуемых статистически значимых различий не выявлено ($p = 0,881$), Таблица 19.

При оценке послеоперационных параметров на 14 ± 3 -и сутки после операции в группе детей с эффективной операцией Касаи уровень ХС, ЩФ, ОБ, ПБ и АСТ были статистически значимо ниже (Таблица 20).

Таблица 17 – Результаты сравнения частоты эффективности операции Касаи (абс., %) в зависимости от ультразвуковых факторов

Фактор	Частота эффективности операции				p	ОИ; 95%-й ДИ
	Наличие фактора		Отсутствие фактора			
	абс.	%	абс.	%		
Наличие ЖП	n = 111		n = 55		0,006*	3,56 (1,45–8,75)
	58	52,3	11	20,0		
Неоднородная ткань печени	n = 31		n = 135		0,084	3,13 (0,91–10,8)
	17	54,8	52	38,5		
Повышенная эхогенность печени	n = 101		n = 65		0,417	0,72 (0,32–1,61)
	36	35,6	33	50,7		
Спленомегалия	n = 89		n = 77		0,650	1,29 (0,58–2,85)
	38	42,6	31	40,2		
Асцит	n = 11		n = 155		0,213	1,39 (0,09–1,59)
	3	27,3	66	42,5		
Закругленный край печени	n = 59		n = 107		0,083	0,37 (0,12–1,17)
	16	27,1	53	49,5		
Наличие фиброзной площадки	n = 88		n = 78		0,636	0,81 (0,33–1,96)
	40	45,5	29	37,2		
<i>Примечание – * – различия показателей статистически значимы (p < 0,05)</i>						

Таблица 18 – Сравнительный анализ ультразвуковых данных до проведения операции Касаи в исследуемых группах

Параметры	Операция Касаи		p
	эффективна	неэффективна	
	Me [Q1; Q3]	Me [Q1; Q3]	
Количество пациентов	69	97	
Длина ЖП, мм	13,0 [9,0; 19,5]	9,0 [7,5; 16]	0,12
Ширина ЖП, мм	4,0 [3,0; 5,0]	3,0 [2,1; 4,4]	0,085
Фиброзная площадка, мм	3,0 [0; 4,4]	3,0 [0; 3,7]	0,99
Правая доля ПЗ р-р, мм	68 [62; 76]	71 [67; 75]	0,58
Левая доля ПЗ р-р, мм	44 [40; 52]	43,5 [40,0; 48,0]	0,66
Селезенка длина, мм	62 [55; 69]	58 [53; 68]	0,31
Селезенка ширина, мм	29 [24; 32]	26 [23; 30]	0,071
Печеночная артерия ИР	0,71 [0,68; 0,76]	0,74 [0,69; 0,77]	0,40
Печеночная артерия, скорость кровотока	57,5 [39,5; 66,0]	68,0 [49,0; 73,0]	0,34
Печеночная артерия диаметр, мм	2,10 [1,55; 2,45]	1,95 [1,55; 2,45]	0,64
Воротная вена диаметр, мм	4,0 [3,7; 4,5]	4,0 [3,8; 4,8]	0,97
Воротная вена, скорость кровотока	20 [20; 25]	21,5 [19,5; 24]	0,69

Таблица 19 – Результаты сравнения частоты эффективности операции Касаи (абс., %) в зависимости от степени выраженности фиброза печени по шкале Десмет

Степень фиброза по шкале Десмет, балл	Частота эффективности		p
	Эффективна / общее количество	%	
0	1/2	50,0	0,881
1	11/20	55,0	
2	47/86	54,6	
3	13/25	52,0	
4	15/33	45,4	

Таблица 20 – Сравнительный анализ клинико-лабораторных данных после проведения операции Касаи (на 14±3-й день) в исследуемых группах

Параметры	1-я группа, (N = 69)	2-я группа, (N = 97)	p
	Me [LQ – UQ]	Me [LQ – UQ]	
Тромбоциты, *10 ⁹ /л	361 [283,5–543]	382,5 [315–500]	0,63
Альбумин, г/л	36,4 [34,3–39,95]	38,0 [34,5–40,5]	0,372
ХЭ, Ед/л	4874 [4128–5931]	4660 [3817–6020]	0,681
ГГТ, Ед/л	796,3 [550,5–1125,0]	893,9 [570,5–1183,1]	0,599
ХС, ммоль/л	4,7 [4,23–5,57]	5,5 [4,54–7,60]	0,004*
ЩФ, Ед/л	261 [205–371]	327 [273–395]	0,019*
Билирубин общий, мкмоль/л	60,9 [36,7–88,0]	117,2 [84,0–154,3]	< 0,001*
Билирубин прямой, мкмоль/л	36,8 [20,9–56,3]	74,5 [49,9–95,6]	< 0,001*
АЛТ, Ед/л	196,5 [145–269]	222,2 [143,2–365,5]	0,07
АСТ, Ед/л	177,9 [123,5–230,5]	211,8 [160,0–299,8]	0,038*
Фибриноген, г/л	2,41 [1,90; 2,80]	2,38 [1,95; 2,80]	0,685
МНО	1,04 [0,97–1,12]	0,99 [0,92–1,13]	0,521
ТВ, сек	17,9 [16,4–19,1]	17,3 [16,3–19,3]	0,421
ПТИ, %	96,3 [88,5–107]	96,5 [80,8–109]	
APRI	1,25 [0,79–1,66]	1,29 [0,86–2,62]	0,316
Р-ры печени: п/п линия, см	4,0 [3,0–4,0]	4,0 [4,0–5,0]	0,294
Р-ры печени: среднеключичная линия, см	4,0 [3,0–4,0]	4,0 [3,0–4,5]	0,551
Р-ры селезенки, см	2,0 [0,5–3,0]	2,0 [0,75–4,25]	0,250
<i>Примечание – * – различия показателей статистически значимы (p < 0,05)</i>			

На основании выявленных различий в сравнительном анализе ($p < 0,05$) нами был проведен однофакторный логистический регрессионный анализ для определения влияния каждого фактора отдельно на исход (Таблица 21),

Таблица 21 – Однофакторный анализ лабораторных и ультразвуковых предикторов вероятности эффективности операции Касаи

Параметры	Нескорректированное отношение шансов		
	ОШ	95%-й ДИ	p
ХС, ммоль/л (д/о)	1,00	1,00–1,00	0,056
ХС, ммоль/л (п/о)	0,66	0,51–0,86	0,002*
ЩФ, Ед/л (п/о)	0,99	0,99–1,00	0,099
ОБ, ммоль/л (п/о)	0,98	0,97–0,99	0,001*
ПБ, ммоль/л (п/о)	0,98	0,97–0,99	0,003*
АСТ, Ед/л (п/о)	0,99	0,99–1,00	0,042*
Наличие ЖП по УЗИ	3,56	1,45–8,75	0,006
<i>Примечание – * – различия показателей статистически значимы (p < 0,05)</i>			

Выявлена значимость по уровню холестерина п/о (ОШ: 0,66; 95%-й ДИ 0,51–0,86; p = 0,002), общего билирубина п/о (ОШ: 0,98; 95%-й ДИ 0,97–0,99; p = 0,001), прямого билирубина п/о (ОШ: 0,98; 95%-й ДИ 0,97–0,99; p = 0,003), АСТ п/о (ОШ: 0,99; 95%-й ДИ 0,99–1,00; p = 0,042), наличие ЖП по данным УЗИ (ОШ: 3,56; 95%-й ДИ 1,45–8,75; p = 0,006),

Показатели с p < 0,05 в однофакторном регрессионном анализе были включены для построения многофакторной прогностической модели вероятности эффективности операции Касаи,

Наблюдаемая зависимость описывается уравнением (3):

$$P = \frac{1}{1 + e^{-z}} \times 100\%, \quad (3)$$

$$z = 4,00 + 1,28 \times X_{\text{ЖП}} - 0,61 \times X_{\text{ХС-по}} - 0,03 \times X_{\text{БП-по}},$$

где P – вероятность эффективности операции Касаи (%);

X_{ЖП} – наличие желчного пузыря по данным УЗИ (0 – отсутствие ЖП, 1 – наличие ЖП);

X_{ХС-по} – уровень холестерина после операции (ммоль/л);

X_{БП-по} – уровень прямого билирубина после операции (мкмоль/л).

Полученная регрессионная модель является статистически значимой (p < 0,001). Исходя из значения коэффициента псевдо-R² (детерминации Найджелкерка), модель (3) учитывает 46,8% факторов, определяющих дисперсию вероятности эффективности операции Касаи.

Исходя из значений регрессионных коэффициентов, наличие желчного пузыря по данным УЗИ имели прямую связь с вероятностью эффективности операции Касаи. Такие предикторы, как уровень холестерина и прямого билирубина на 14 ± 3 -и сутки после операции отличались обратной связью с вероятностью эффективности операции Касаи. Пороговое значение логистической функции P было определено с помощью метода анализа ROC-кривых. Полученная кривая представлена на Рисунке 19. Площадь под ROC-кривой составила $0,85 \pm 0,04$ (95%-й ДИ $0,77-0,93$). Значение логистической функции (3) в точке cut-off составило 51,24%. При значениях $P > 51,24\%$ определялся высокий риск эффективности операции Касаи, а при значениях $P < 51,24\%$ – низкий риск эффективности операции Касаи. Чувствительность и специфичность модели (3) при данном пороговом значении составили 81,0% и 80,8% соответственно. Диагностическая эффективность 80,9%.

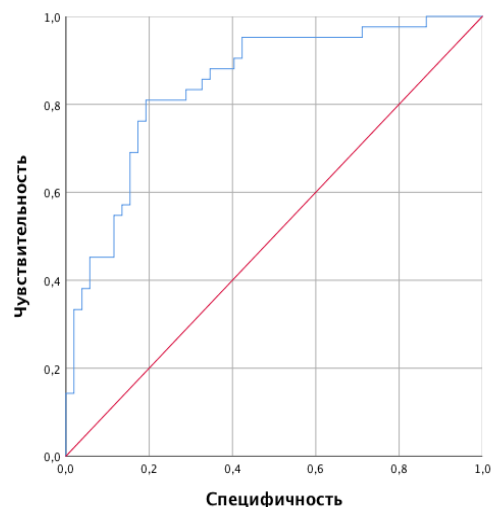


Рисунок 19 – ROC-кривая, характеризующая зависимость вероятности эффективности операции Касаи от значений прогностической функции (3)

Наличие ЖП по данным УЗИ увеличивают шансы эффективности операции Касаи в 3,62 раза (95%-й ДИ $1,09-12,0$), увеличение содержания холестерина на 1 ммоль/л после операции уменьшают шансы эффективности операции в 1,85 раз (95%-й ДИ $0,36-0,82$), увеличение содержания прямого билирубина на 1 мкмоль/л после операции Касаи уменьшают шансы эффективности операции в 1,03 раз (95%-й ДИ $0,95-0,98$) (Таблица 22).

Таблица 22 – Многофакторный анализ лабораторных и ультразвуковых предикторов модели 1 с вероятностью эффективности операции Касаи

Параметры	Скорректированное отношение шансов;	95%-й ДИ		p
		нижний	верхний	
Наличие ЖП по данным УЗИ	3,618	1,088	12,029	0,036*
Уровень холестерина после операции	0,541	0,357	0,821	0,004*
Уровень прямого билирубина после операции	0,969	0,951	0,987	0,001*
<i>Примечание – * – Влияние предиктора статистически значимо (p < 0,05)</i>				

Учитывая, большую клиническую значимость степени фиброза печени, оцененной при гистологическом исследовании биоптата печени на момент проведения операции Касаи, нами была разработана 2-я модель с изучением влияния данного показателя методом принудительного включения, как в однофакторную, так и в многофакторную прогностическую модель эффективности операции Касаи (Таблицы 23, 24).

Таблица 23 – Однофакторный анализ лабораторных и гистологических предикторов вероятности эффективности операции Касаи

Параметры	Нескорректированное отношение шансов		
	ОШ	95%-й ДИ	p
ХС, ммоль/л (д/о)	1,00	1,00–1,00	0,056
ХС, ммоль/л (п/о)	0,66	0,51–0,86	0,002*
ЩФ, Ед/л (п/о)	0,99	0,99–1,00	0,115
ОБ, ммоль/л (п/о)	0,98	0,97–0,99	0,001*
ПБ, ммоль/л (п/о)	0,98	0,97–0,99	0,003*
АСТ, Ед/л (п/о)	0,99	0,99–1,00	0,042*
Степень фиброза печени по шкале Десмет	0,91	0,56–1,47	0,698
<i>Примечание – * – Влияние предиктора статистически значимо (p < 0,05)</i>			

Таблица 24 – Многофакторный анализ лабораторных и гистологических предикторов модели 2 с вероятностью эффективности операции Касаи

Предикторы	ОШ	95%-й ДИ		p
ХС, ммоль/л (п/о)	0,519	0,331	0,812	0,004*
ПБ, ммоль/л (п/о)	0,965	0,942	0,989	0,005*
Степень фиброза печени по шкале Десмет	0,453	0,216	0,950	0,036*
Примечание — * – Влияние предиктора статистически значимо (p < 0,05)				

Наблюдаемая зависимость описывается уравнением (4):

$$P = \frac{1}{1 + e^{-z}} \times 100\%, \quad (4)$$

$$z = 6,89 - 0,59 \times X_{\text{ХС-ПО}} - 0,37 \times X_{\text{БП-ПО}} - 0,76 \times X_{\text{ДЕСМЕТ}},$$

где P – вероятность эффективности операции Касаи (%);

$X_{\text{ХС-ПО}}$ – уровень холестерина через 2 недели после операции (Ед/л);

$X_{\text{БП-ПО}}$ – уровень прямого билирубина через 2 недели после операции (мкмоль/л).

$X_{\text{ДЕСМЕТ}}$ – степень выраженности фиброза по шкале Десмет (1, 2, 3, 4).

Полученная регрессионная модель является статистически значимой ($p < 0,001$). Исходя из значения коэффициента детерминации Найджелкерка, модель (1) учитывает 47,3% факторов, определяющих дисперсию вероятности эффективности операции Касаи.

Исходя из значений регрессионных коэффициентов, вероятность эффективности операции Касаи увеличивалась при снижении показателей холестерина и прямого билирубина на 14 ± 3 -и сутки после операции, а также при более низкой степени фиброза по шкале Десмет на момент операции.

Пороговое значение логистической функции P было определено с помощью метода анализа ROC-кривых. Полученная кривая представлена на Рисунке 20. Площадь под ROC-кривой составила $0,86 \pm 0,04$ (95%-й ДИ 0,78–0,95). Значение логистической функции (4) в точке cut-off составило 54,32%. При значениях $P > 54,32\%$ определялась высокая вероятность эффективности операции Касаи, а при значениях $P < 54,32\%$ – вероятность эффективности операции Касаи низкая. Чувствительность и специфичность модели (4) при данном пороговом значении составили 78,8% и 78,4%, соответственно.

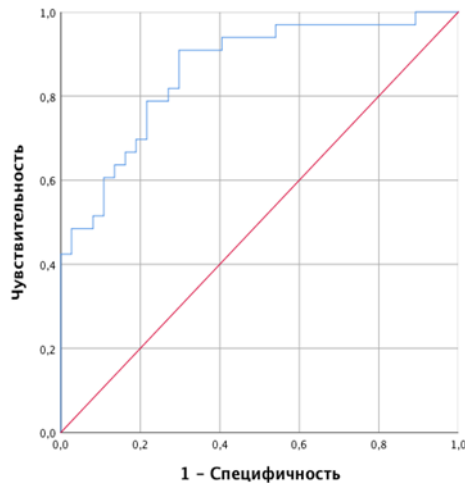


Рисунок 20 – ROC- кривая, характеризующая зависимость вероятности эффективности операции Касаи от значений прогностической функции (4)

Увеличение выраженности фиброза на 1 балл на момент операции снижает шансы на эффективность операции в 2,2 раза (95%-й ДИ 0,27–0,95), увеличение холестерина на 1 ммоль/л после операции снижает шансы на эффективность операции в 1,92 раза (95%-й ДИ 0,33–0,81), повышение прямого билирубина на 1 мкмоль/л после операции Касаи снижает шансы на эффективность операции в 1,04 раза (95%-й ДИ 0,94–0,98) (Таблица 24).

Так как в модели наиболее значимыми факторами оказались уровень прямого билирубина и холестерина после операции, для данных показателей нами был проведен ROC-анализ.

При оценке зависимости вероятности эффективности операции Касаи от значений уровня прямого билирубина, измеренного через 14 ± 3 дня после операции, была получена ROC-кривая (Рисунок 21). Полученная ROC-кривая характеризовалась значением AUC, равным $0,79 \pm 0,04$ (95%-й ДИ 0,7–0,88). Модель была статистически значимой ($p < 0,001$).

Значение уровня прямого билирубина в точке cut-off составило 56,3 мкмоль/л: при содержании прямого билирубина ниже 56,3 мкмоль/л через 2 недели после операции отмечалась высокая вероятность эффективности операции, а при значениях $> 56,3$ мкмоль/л – вероятность эффективности операции

снижалась. Чувствительность и специфичность модели при выбранном пороговом значении прямого билирубина составляла 74,5% и 71,2% соответственно.

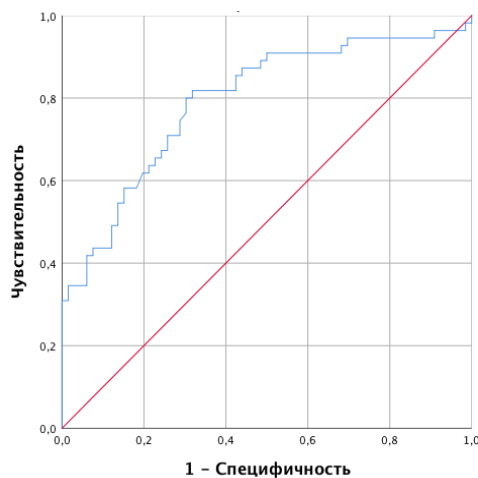


Рисунок 21 – ROC-кривая, характеризующая зависимость эффективности операции Касаи от уровня прямого билирубина через 14 ± 3 дня после операции

При оценке зависимости вероятности эффективности операции Касаи от значений уровня холестерина, измеренного через 14 ± 3 дня после операции, была получена ROC-кривая (Рисунок 22).

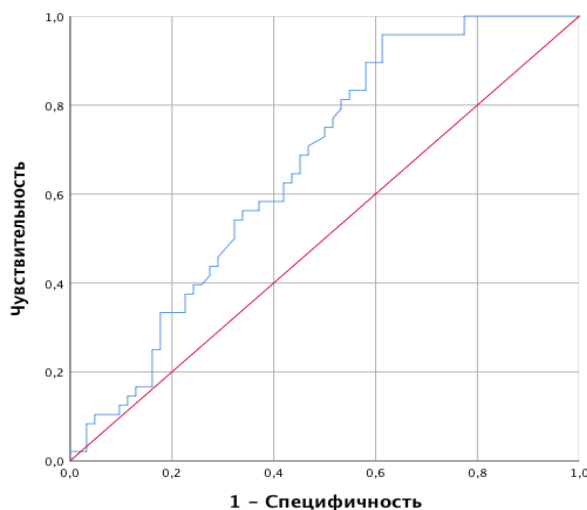


Рисунок 22 – ROC – кривая, характеризующая зависимость эффективности операции Касаи от уровня холестерина через 14 ± 3 дня после операции

Полученная ROC-кривая характеризовалась значением AUC, равным $0,66\pm 0,05$ (95%-й ДИ 0,56–0,76). Значение уровня холестерина в точке cut-off составило 5,41 ммоль/л: при значениях холестерина $< 5,41$ ммоль/л через 2 недели после операции увеличивалась вероятность эффективности операции Касаи, а при

значениях $> 5,41$ ммоль/л вероятность эффективности операции снижалась. Модель была статистически значимой ($p = 0,004$). Чувствительность и специфичность модели при выбранном пороговом значении холестерина составляла 70,8% и 53,2% соответственно.

Учитывая ретроспективный дизайн исследования, мы рассмотрели показатели выживаемости с нативной печенью в группах пациентов с эффективной и неэффективной операцией Касаи.

Средняя продолжительность жизни с нативной печенью в группе пациентов с неэффективной операцией Касаи составила $9,7 \pm 0,7$ месяцев. Семь пациентов с неэффективной операцией Касаи (7,2% из этой группы, $n = 97$) умерли до проведения трансплантации печени, в возрасте $10,4 \pm 4,4$ месяцев, в результате печеночной недостаточности; остальным 90/97 пациентам (92,8%) была выполнена трансплантация печени. В группе с эффективной операцией Касаи средняя продолжительность жизни с нативной печенью составила $151,1 \pm 14,5$ месяцев. Несмотря на эффективность операции Касаи, у 11 пациентов (16,2% из этой группы, $n = 69$) в исходе развилась печеночная недостаточность, и им была выполнена трансплантация печени в возрасте 28,3 месяцев (14,6; 58,3). Тем не менее риск потребности в проведении трансплантации печени существенно зависел от эффективности операции Касаи ($p < 0,001$ по лог-ранг критерию Мантеля-Кокса) (Рисунок 23).

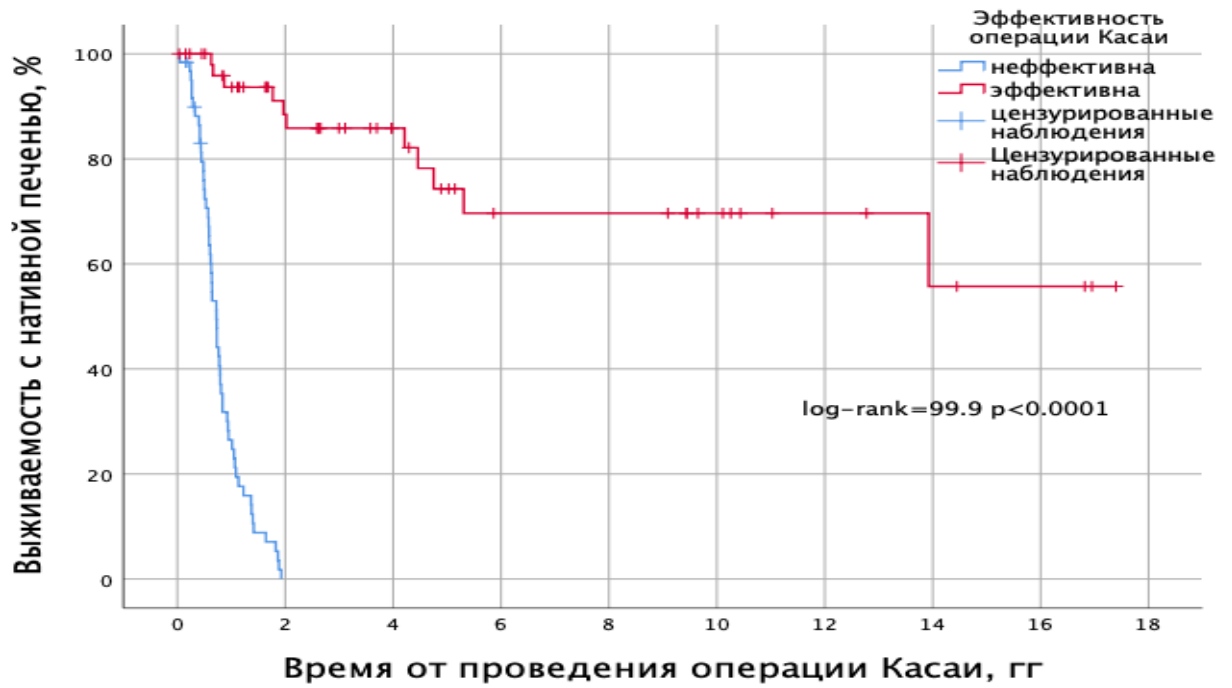


Рисунок 23 – Кривые Каплана – Мейера, характеризующие выживаемость с нативной печенью в группе с эффективной и неэффективной операцией Касаи

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Билиарная атрезия – это наиболее распространенное заболевание гепатобилиарной системы у детей первых месяцев жизни, составляя 45% всех случаев [2]. Кроме того, является наиболее распространенной причиной, обуславливающей необходимость проведения трансплантации печени в педиатрической практике. [10, 166]. Первым этапом лечения БА является операция Касаи, однако эффективность операции варьирует от 36–61% в Европе и по данным Masaki Nio эффективность ПЭ в Японии составляет 87.2% [134, 190, 206]. В нашем исследовании эффективность ПЭ составила 42%. При отсутствии эффекта после ПЭ необходимо проведение ТП в течение 6–12 месяцев после операции, вследствие развития печеночной недостаточности [80, 106, 171, 178]. При краткосрочной оценке результатов портоэнтеростомии общепринятые критерии включают: появление окрашенного стула после операции, купирование желтухи, а также снижение концентрации общего билирубина до значений менее 34 мкмоль/л в течение 3–6 месяцев. Учитывая, что заболевание быстро прогрессирует и приводит к формированию ЦП, который требует проведения трансплантации печени, выявление ранних предикторов эффективности операции Касаи позволит оптимизировать тактику ведения как в краткосрочной, так и в долгосрочной перспективе. Определение в ранний послеоперационный период признаков неэффективности ПЭ позволит своевременно направить ребенка в центр трансплантологии, обеспечит подбор и подготовку донора, позволит оптимизировать диету- и медикаментозную терапию, провести обучение и консультирование родителей. В нашем исследовании, после проведения ПЭ и на этапе ожидания ТП, у 8/66 (4,8%) пациентов развился летальный исход. Вероятно, наличие достоверных прогностических маркеров позволило бы своевременно прогнозировать неэффективность ПЭ у данной группы пациентов.

Наиболее часто описывают и коррелируют с эффективностью операции Касаи такие факторы как: возраст на момент проведения операции [12, 77, 163, 191], уровень билирубина и трансаминаз в раннем послеоперационном периоде [41,

163, 198], использование стероидной терапии в послеоперационном периоде [66], а также данные гистологического исследования биоптата печени на момент проведения операции [38]. Тем не менее, до сих пор нет однозначных и общепризнанных прогностических маркеров эффективности ПЭ.

Возраст на момент проведения операции Касаи описывается как наиболее значимый фактор, определяющий ее эффективность. Считалось, чем старше возраст ребенка на момент проведения операции, тем ниже ее эффективность [12, 77, 191], в связи с чем существует мнение, что у детей старше 90 дней жизни на первом этапе следует проводить ТП без предшествующей операции Касаи. Вместе с тем, исследования последних лет подтверждают, что изолированный показатель, такой как возраст на момент ПЭ, не является определяющим фактором для однозначного прогнозирования исхода [21, 113, 115]. В своем исследовании мы также не получили статистически значимых различий в возрасте пациентов на момент проведения операции Касаи (80 дней vs 77 дней, $p = 0,777$) как в сравнительном анализе, так и при проведении регрессионного анализа. Однако в ходе проведения корреляционного анализа нами была выявлена значимая корреляция между возрастом пациента на момент выполнения операции Касаи и степенью фиброза печени, определенной при морфологическом исследовании биопсийного материала печени ($r_s = 0,805$; $p < 0,001$). Ряд работ подтверждают значимость выраженности фиброза печени, как фактора, неблагоприятно влияющий на исход ПЭ [156]. В связи с чем данный показатель был нами включен в многофакторный регрессионный анализ, была подтверждена значимость степени выраженности фиброза печени на исход ПЭ. Таким образом, по результатам нашей работы, влияние на исход операции оказывает не отдельно взятый параметр, как возраст на момент проведения ПЭ, а степень фиброза печени, которая, как правило, прогрессирует с возрастом пациента.

Важным прогностическим критерием эффективности операции является функция печени, оцененная лабораторными методами. В своем исследовании при оценке функции печени методом сравнительного анализа наиболее значимым фактором явился уровень холестерина в крови как до операции, так и после

проведения ПЭ. В группе детей с эффективной операцией Касаи уровень холестерина в крови был статистически значимо ниже, чем в группе с неэффективной. Более того, значимость данного показателя была подтверждена при проведении регрессионного анализа: уровень холестерина, исследованный на 14 ± 3 сутки п/о, являлся статистически значимым предиктором как в однофакторной, так и в многофакторной модели при оценке эффективности ПЭ. На сегодняшний день не имеется публикаций, которые описывали бы значимость холестерина как предиктора эффективности ПЭ. На наш взгляд, холестерин в данном случае отражает степень выраженности холестаза так же, как и уровень прямого билирубина, роль которого в купировании холестаза после проведения ПЭ подтверждена ранее проведенными исследованиями [132, 159]. В настоящем исследовании была подтверждена и значимость прямого билирубина в послеоперационном периоде как прогностического фактора исхода ПЭ; уровень общего и прямого билирубина был статистически значимо ниже при проведении сравнительного анализа на 14 ± 3 -и сутки п/о в группе детей с эффективной ПЭ.

При проведении как сравнительного, так и однофакторного регрессионного анализа, статистически значимые различия были выявлены и по уровню АСТ исследованного на 14 ± 3 -й день п/о. В группе с эффективной ПЭ данный показатель был статистически значимо ниже, чем при неэффективной ($p = 0,042$). Однако при построении многофакторной прогностической модели значение АСТ не явилось значимым. В исследовании, проведенном Goda Т. и соавт. [198] при проведении ROC-анализа было продемонстрировано, что достоверными предикторами исхода операции Касаи являются комбинация прямого билирубина ниже $0,7$ мг/дл ($11,97$ мкмоль/л) (чувствительность 93%, специфичность 75%) и АСТ ниже 94 Ед/л (чувствительность 87%, специфичность 71%) через 2 месяца после операции Касаи. При проведении ROC анализа в нашей работе была подтверждена значимость уровня прямого билирубина, исследованного на 14 ± 3 -й день п/о; при уровне прямого билирубина ниже $56,3$ мкмоль/л отмечалась высокая вероятность эффективности операции. Чувствительность и специфичность модели при

выбранном пороговом значении прямого билирубина в нашем исследовании составила 74,5% и 71,2%, соответственно.

С клинической точки зрения большой интерес представляет определение маркеров эффективности операции Касаи до ее проведения. В сравнительном анализе нами были выявлены статистически значимые различия по уровню холестерина; в группе с эффективной ПЭ показатель был статистически значимо ниже (5,34 vs 6,29; $p = 0,018$), а также тенденция в значимости по уровню ЩФ и прямого билирубина. В нескольких, ранее проведенных исследованиях, подчеркивается значимость предоперационного уровня ЩФ. У пациентов с эффективной ПЭ показатели ЩФ были значимо ниже ($400,9 \pm 253,3$ Е/л vs $586,7 \pm 274,9$ Е/л; $p = 0,004$, и $366,3 \pm 154,3$ Е/л vs $485,1 \pm 291,3$ Е/л, $p = 0,01$) [124, 164]. В нашем анализе данный показатель не имел значимой прогностической ценности в моделях бинарной логистической регрессии, хотя их вклад теоретически возможен и может быть уточнен на более крупных когортах пациентов.

Большое внимание уделяется изучению связи исхода ПЭ с изменениями в ткани печени при гистологическом исследовании. Мальформация протоковой пластинки, выраженность фиброза, пролиферация желчных протоков и выраженность холестаза – признаки, которые наиболее часто ассоциируют с неблагоприятным исходом [38, 156, 159]. В рамках этого исследования, при сопоставлении частоты эффективности операции Касаи в связи с различными степенями фиброза, статистически значимые отличия не были обнаружены. В дальнейшем данный параметр был включен в многофакторный анализ при проведении бинарной логистической регрессии; была выявлена значимость фиброза печени, оцененной при морфологическом исследовании биоптата интраоперационно, наряду со скоростью снижения прямого билирубина и холестерина в послеоперационном периоде. Согласно нашему исследованию, увеличение степени фиброза печени на 1 балл уменьшает шансы эффективности ПЭ в 2,2 раза (95%-й ДИ 0,27–0,95).

Широкое применение в педиатрической гепатологии получило УЗИ благодаря доступности, неинвазивности и скорости получения результатов.

Ультразвуковое исследование применяется, как в диагностике БА, так и при динамическом наблюдении за детьми с данной патологией.

В литературе приведены следующие диагностические УЗ-признаки БА: симптом треугольного рубца, «пузырь – приведение» – уменьшенный в размерах ЖП с неравномерным контуром, увеличение диаметра печеночной артерии, наличие субкапсулярного кровотока [94, 95, 161, 202]. На сегодняшний день имеются лишь единичные публикации, в которых данные ультразвукового исследования изучались с целью предикции исхода портоэнтеростомии [48, 180, 207]. В исследовании, проведенном Jeon T. Y., при проведении многофакторного анализа с анализом ультразвуковых параметров, было установлено, что расширение диаметра печеночной артерии более 1,9 мм и наличие спленомегалии по данным УЗИ требовало проведения ранней трансплантации печени [180]. В своей работе мы не выявили значимых различий по данным доплерографического исследования. Однако согласно результатам нашего исследования, частота эффективности ПЭ увеличивается при выявлении рудиментированного желчного пузыря до операции по данным УЗИ. Данный параметр продемонстрировал свою значимость как в сравнительном анализе, так и при проведении, как однофакторного, так и многофакторного регрессионного анализа. В исследовании, проведенном Sun Song и соавт. [48] указывается, что выявление «кистозной структуры» / псевдокист в воротах печени по данным УЗИ до операции ассоциировано с благоприятным исходом операции Касаи. Стоит отметить, что вышеуказанное исследование было проведено с участием 71 пациента, в то время как в наше исследование вошло 166 детей.

Таким образом, результаты настоящего исследования демонстрируют, что выявление рудиментированного ЖП до операции по данным УЗИ в сочетании со значимым снижением уровня холестерина и прямого билирубина в крови являются маркерами эффективности операции Касаи у детей с билиарной атрезией.

Одной из важных и актуальных проблем во всем мире является поздняя диагностика заболевания и, следовательно, позднее проведение оперативного вмешательства при БА у детей. Так, по данным различных авторов, средний

возраст на момент проведения ПЭ в США составляет от 48,5 до 65 дней жизни, во Франции 59 и в Японии 68,1 [99, 134, 145, 168]. В проведенном нами исследовании средний возраст детей на момент операции Касаи составил 78,8 (15,2) дней [4]. Анализ, проведенный нами, выявил, что в 32% случаев хирургическое лечение у детей осуществлялось в возрасте старше 3 месяцев жизни. Задержка в проведении хирургической коррекции может быть обусловлена поздним выявлением заболевания вследствие отсутствия явных клинических симптомов в неонатальный период и недостаточной осведомленностью врачей. Таким образом, в нашем исследовании 158/170 (93%) детей с билиарной атрезией родились в срок, в стабильном состоянии, при этом их антропометрические показатели соответствовали гестационному возрасту, что не противоречит ранее описанным данным [4, 63, 175, 196]. У 115/142 (81%) желтуха появилась на первой неделе жизни, что является типичным периодом для физиологической желтухи, и не вызывала опасений у врачей-неонатологов. Исследование фракций билирубина было проведено только 16% больным. У всех обследованных детей обнаружено повышение не только общего, но и прямого билирубина, однако это не стало основанием для дополнительного исследования [4]. Тем не менее, именно увеличение прямой фракции билирубина в раннем неонатальном периоде считается высокочувствительным индикатором холестатических заболеваний печени, включая билиарную атрезию [4]. В то же время другие биохимические маркеры холестаза и трансаминазы могут находиться в пределах нормы в течение первого месяца жизни [4, 76, 91, 179]. Это было подтверждено в нашем исследовании: у всех детей, которым проведен анализ данных биохимических маркеров, показатели были в пределах нормы. Однако следует отметить небольшое число наблюдений (16 детей) и максимальный возраст пациентов 12 дней жизни [4]. Ранее исследователями из США и Великобритании было обнаружено, что у всех детей с заболеваниями печени отмечается повышение прямой фракции билирубина, которое имеет 100% чувствительность и 99,5% специфичность [4]. В исследовании Nagavat S. и соавт. [93] было показано, что у 34 из 61 детей с диагнозом билиарной атрезии уровень прямого билирубина, измеренный в течение

первых 24–48 часов жизни, был значительно выше по сравнению с контрольной группой ($23,9 \pm 7,3$ ммоль/л и $3,2 \pm 1,2$ ммоль/л соответственно; $p < 0,0001$), даже при значениях общего билирубина, не требующих фототерапии [4]. В другом исследовании, включающем 23 415 новорожденных в возрасте до 28 суток жизни [214], было обнаружено повышение уровня прямого билирубина выше 18 ммоль/л в ранний неонатальный период у 3,8% детей, у которых была диагностирована билиарная атрезия [4]. Соотношение «прямой билирубин/общий билирубин» выше 20% было обнаружено у 3 746 (16%) исследованных, у 107 новорожденных (0,46%) были повышены оба показателя [214]. У детей без патологии печени такие изменения не были обнаружены [4].

Ахолия стула считается характерным симптомом билиарной атрезии, однако в большинстве случаев она появляется после мекония, то есть, обычно после выписки из родильного дома, что затрудняет правильную оценку стула врачом-неонатологом [4]. В нашем исследовании ретроспективный анализ показал появление обесцвеченного стула у 91/170 (53,5%) детей отмечалось после отхождения мекония [4]. В настоящее время во многих странах разработаны и внедрены скрининговые программы оценки цвета стула, предназначенные, в первую очередь, для родителей, основанные на использовании карты стула новорожденного [22, 89, 98, 169]. Эти карты включают набор цветов при норме и патологии. В анализе, проведенном Lien T. H. и соавт. [67], после внедрения скрининговой программы, процент детей с билиарной атрезией, прооперированных до 60 суток, значительно возрос с 49,4% до 65,7% [4]. В свою очередь, эффективность операции в виде снижения уровня билирубина в течение 3 месяцев в группе с ранней диагностикой составляла 60,8% по сравнению с 34,8% у пациентов с поздней диагностикой [4]. Кроме того, авторами продемонстрирована более высокая 3- и 5-летняя выживаемость с собственной печенью после внедрения скрининговых программ [4]. Так, до внедрения данной программы 3-летняя выживаемость составляла 31,5%, а после внедрения она увеличилась до 56,9% ($p < 0,001$) [4]. Соответственно, 5-летняя выживаемость с нативной печенью возросла с 27,3% до 64,3% ($p < 0,001$) [4].

В нашем исследовании ультразвуковое исследование органов брюшной полости в раннем неонатальном периоде было проведено только 58 пациентам (34%) [4]. Ни у одного из новорожденных не было обнаружено патологических изменений в печени и селезенке, что соответствует имеющимся данным в литературе [4, 57, 161]. Один из патогномичных признаков БА – симптом "треугольного рубца", представляющий собой гиперэхогенный продолговатый тяж, располагающийся над стволом воротной вены [4]. В ходе проведенного нами исследования не было описано появление симптома «треугольного рубца» у ни одного из наблюдаемых пациентов, что можно объяснить отсутствием признаков фиброза печени при рождении и постепенным его формированием в дальнейшем [4]. Согласно исследованиям, данный симптом обычно проявляется после 30–60 дней жизни и не обнаруживается в раннем неонатальном периоде [4, 64, 149]. У большинства обследованных детей наблюдается уменьшение просвета желчного пузыря или его отсутствие при ультразвуковом исследовании, но такое же УЗ-изображение может быть характерно и для здоровых новорожденных, так как исследование в родильном доме часто проводится после кормления, и желчный пузырь может быть частично или полностью сокращен [4] (Рисунок 8 Б).

Среди обследованных нами детей у 33/170 (19,4%) в неонатальном периоде до установления диагноза БА развился геморрагический синдром различной степени выраженности и локализации [4]. При этом внутричерепные кровоизлияния были выявлены у 7 детей, последствием чего стала различная степень неврологических нарушений – от синдрома мышечной дистонии до гемипареза и задержки моторного и психоречевого развития [4]. Патогенез данного состояния связан с мальабсорбцией жирорастворимых веществ, включая витамин К, вследствие недостаточного поступления желчных кислот в просвет кишечника. Это приводит к развитию дефицита витамина К, что может вызвать нарушение факторов свертываемости крови и, как результат, развитие геморрагических осложнений. В свою очередь, раннее выявление и дополнительная дотация витамином К могут предотвратить развитие этого осложнения [4, 23]. Таким образом, разработанный алгоритм обследования детей с наличием желтухи

позволит своевременно диагностировать БА у детей и избежать развития жизнеугрожающих осложнений [4].

Операция Касаи имеет паллиативную направленность и не является радикальным методом лечения, она может привести к временному улучшению функции печени, но в 70% случаев послеоперационный ФП продолжает прогрессировать и может привести к развитию ЦП, который характеризуется портальной гипертензией и печеночной недостаточностью [6, 28].

ТП печени детям с БА проводится, как правило, при развитии осложнений, связанных с билиарным циррозом [126]. Наличие либо отсутствие фиброза, а также степень его выраженности оценивается по данным гистологического исследования биоптата печени [183, 203]. Наличие целого ряда недостатков в виде инвазивности исследования, риска развития осложнений в виде болевого синдрома, интраперитонеального кровотечения, гипотензии, а также необходимости использования общей анестезии ограничивают возможности повторного использования данного метода при динамическом наблюдении за детьми для диагностики фиброза и цирроза печени [44, 70]. Кроме того, некоторые исследователи отмечают ограничения гистологического исследования, включающие недостатки в процессе забора образцов и субъективность в оценке и интерпретации полученных данных [6, 5]. В когорте взрослых, пациентов с хроническими заболеваниями печени широко используются неинвазивные тесты для стадирования ФП [6, 68, 127]. В настоящее время в педиатрической практике не разработаны неинвазивные тесты для стадирования фиброза и выявления признаков ЦП [6]. Индекс APRI, который вычисляется путем деления уровня активности аспартатаминотрансферазы (АСТ) на количество тромбоцитов (Aspartat aminotransferase to platelet ratio index) [6], широко используется и имеет высокую диагностическую ценность при оценке степени тяжести ФП у взрослых пациентов [167, 209]. Данный индекс в последние годы используется и в педиатрической практике при таких заболеваниях как: хронический вирусный гепатит В, муковисцидоз и БА [24, 152, 185], но полученные данные противоречивы [24, 27, 65, 90, 186, 194]. Для диагностики степени выраженности

ФП у детей с хроническими заболеваниями печени в педиатрической практике широко используются визуальные методы, такие как доплеровское ультразвуковое исследование [6]. Результаты большинства исследований показывают, что ультразвуковые параметры, такие как спленомегалия, изменение размера печени, наличие неровного контура, гиперэхогенность паренхимы органа и изменение размера воротной и селезеночной вен, могут использоваться для прогнозирования ЦП и ПГ [146, 195]. Однако эти исследования были проведены на взрослых пациентах и детях старшего возраста [6].

Наше исследование проведено для поиска лабораторно-инструментальных маркеров выраженности фиброза/цирроза печени (F3-4 по шкале Десмет) у детей раннего возраста с хроническими заболеваниями печени [6]. Нами выявлены неинвазивные маркеры, которые могут отражать степень фиброза печени. Кроме того, в процессе анализа клинических данных мы выяснили, что значимым фактором является возраст на момент проведения биопсии печени: чем старше ребенок, тем более выражен фиброз печени [6]. Полученный нами результат подтверждается статистическим анализом ($p < 0,001$) [6] и ранее проведенными исследованиями [90, 128].

Согласно настоящему исследованию, наиболее чувствительными биохимическими маркерами являются показатели АСТ, АЛТ и индекс APRI [6]. В исследовании, проведенном Yang Li-Yuan и соавторами, было обнаружено, что при фиброзе печени $> F3$ на момент выполнения операции Касаи отмечается более значимое повышение печеночных трансаминаз по сравнению с группой детей с менее выраженным фиброзом [6, 210]. Анализ, проведенный нами, подтверждает значимость показателей АЛТ, АСТ для оценки степени фиброза перед операцией у детей с билиарным атрезией [6]. При сравнительном анализе уровни АЛТ и АСТ оказались статистически значимо выше у детей с выраженным фиброзом печени (АЛТ 128,3 vs 203,5 Ед/л и АСТ 179,7 vs 262,8 Ед/л). Кроме того, в нашем исследовании была обнаружена корреляционная связь между степенью фиброза и индексом APRI [6].

С практической точки зрения, данный неинвазивный маркер – индекс APRI – представляет большой интерес, поскольку он отражает изменения в ткани печени [6]. Расчет индекса не требует дополнительных финансовых затрат и основан на широкодоступных лабораторных параметрах [6]. Впервые этот индекс был разработан в 2003 году для взрослых пациентов с вирусным гепатитом С и отражает связь между сывороточным уровнем АСТ и количеством тромбоцитов со степенью фиброза печени [6]. Впоследствии были проведены исследования с использованием данного индекса в группе детей с билиарной атрезией и другими холестатическими заболеваниями печени [6, 18, 28, 185]. Однако полученные результаты были противоречивыми [6]. Например, Lind R. С. и соавт. обнаружили, что APRI значительно не различается при различных степенях фиброза ($P = 0,89$) и не коррелирует с выживаемостью детей с нативной печенью при БА ($r_s = 0,08$; $P = 0,67$) [6, 25]. Однако, Kim S. Y. и соавт. [26] продемонстрировали, что APRI существенно различался при показателях F3 и F4 у детей с билиарной атрезией [6]. AUROC для $F \geq 3$ и $F = 4$ составил 0,92 и 0,91 соответственно [6]. Также Grieve A. и соавт. использовали cut-off 1,22 (AUROC = 0,83), и продемонстрировали чувствительность 75% и специфичность 84% для макроскопически определяемого цирроза [6, 90]. Выживаемость с нативной печенью значительно отличалась и увеличивалась у пациентов с более низким показателем APRI ($P = 0,009$) [6, 90]. Подобные результаты были получены Yang L. Y. и соавт. [6, 210]. Результаты нашего исследования согласуются с полученными ранее данными, нами выявлена корреляция степени фиброза, оцененной по шкале Десмет, с индексом APRI ($r_s = 0,827$; $p = 0,001$) [6]. Кроме того, по данным ROC-анализа была подтверждена значимость данного параметра в определении степени фиброза печени [6]. Значение cut-off для APRI составило 1,52, с чувствительностью 73,9% и специфичностью 71,1% соответственно [6].

Помимо клинико-лабораторных показателей, мы также оценили ультразвуковые маркеры, отражающие степень фиброза [6]. В нашей работе значимыми ультразвуковыми параметрами фиброза явились: длина селезенки, диаметр печеночной артерии, индекс резистентности печеночной артерии, а также

индекс Допа/Двв., что совпадает с данными предыдущих работах [6, 147, 182]. В исследовании, проведенном Riahinezhad M. и соавт., было показано, что у детей с ЦП скорость кровотока в воротной вене была статистически значимо ниже по сравнению с детьми без ЦП ($11,6 \pm 4,7$ см/с vs $17,9 \pm 7,3$ см/с) ($p < 0,015$) [6, 61]. В нашем исследовании различий в скорости кровотока по воротной вене не было обнаружено ($21,0$ см/с vs $20,5$ см/с) ($p = 0,6$) [6]. Это, возможно, связано с различием в возрасте исследуемых детей, а также гетерогенностью заболеваний печени, включенных в исследование [6, 61].

Таким образом, было установлено, что показатели АЛТ, АСТ и индекс APRI являются значимыми маркерами для оценки степени фиброза у детей с БА [6]. Кроме того, ультразвуковые маркеры, такие как длина селезенки, диаметр печеночной артерии, индекс резистентности печеночной артерии и индекс Допа/Двв., также оказались значимыми для определения степени фиброза печени [6]. Полученные данные могут быть полезными для клинической практики, позволяя определить степень фиброза и мониторить состояние пациентов с БА и другими холестатическими заболеваниями печени, используя неинвазивные методы, такие как индекс APRI и ультразвуковые показатели [6]. В дальнейшем, возможно, потребуются дополнительные исследования для определения оптимальных пороговых значений и более точной корреляции между различными маркерами и степенью фиброза печени.

Несмотря на длительный период исследовательской работы в данной области, на текущий момент этиология и патогенез БА все еще остаются не в полной мере разгаданными и изученными. Проведенный нами анализ полноэкзомного поиска ассоциаций выявил варианты в генах, которые демонстрируют достоверную связь с БА. Наиболее вероятной причиной развития заболевания, согласно проведенному нами функциональному анализу обогащения, было нарушение сигнальных путей иммунной системы.

Установлено, что в развитии заболевания важную роль играет дисфункция иммунных клеток, таких как: естественные киллеры (NK-клетки), В-лимфоциты, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки, что обуславливает прямое либо опосредованное

повреждение желчных протоков.

Известно, что рецепторы лектинов типа С могут стимулировать развитие адаптивного иммунного ответа, воздействуя на Т-хелперы 1 и Т-хелперы 2 [100]. Именно этот сигнальный путь был наиболее значим у пациентов с БА в проведенном нами анализе.

HLA-DRB1, полиморфизмы rs1136756, rs9269956 и rs9269957 которого были обнаружены нами в ассоциативном исследовании, изучались в работах, посвященных билиарной атрезии. В некоторых из них [97, 116] не было обнаружено никакой связи ни с *HLA-DRB1*, ни с локусом *HLA* в целом. Тем не менее в японской популяции [102] наблюдалась ассоциация заболевания с *HLA-DR2*.

В проведенном нами анализе не был выявлен ни один вариант генов ресничек холангиоцитов [104].

Известно, что нейтрофилы играют важную роль в патогенезе БА, повреждая желчные протоки. В исследовании, проведенном Zhang, Ruizhong и соавт., продемонстрировано, что нейтрофилы, экспрессирующие протеин CD177⁺, играли важную роль в повреждении желчных протоков за счет продукции специфического вещества (NET), роль которого заключается в борьбе с патогенами, однако данное вещество способно повреждать и ткани организма. Наряду с этим ингибирование CD177⁺ нейтрофилов у пациентов с БА до и через 1 неделю после проведения ПЭ улучшило ее исход [47]. В нашем исследовании варианты генов *CNN2*, *PRSS3*, *HRNR*, *SLC2A3*, *ALDH3B1*, *FCGR3B*, *LILRB3*, участвующие в пути дегрануляции нейтрофилов, достоверно отличались у пациентов с БА в сравнении 637 здоровыми детьми.

Ранее описан вариант гена *GOLGA6L2*, который был детектирован в исследовании 10 пациентов с изолированной билиарной атрезией [215]. В рамках настоящего исследования в этом гене обнаружен вариант (rs755747181), который был представлен в аддитивной и доминантной модели, отличающей пациентов с БА от контрольных образцов.

При стратификации выборки БА на группы с эффективной и неэффективной операцией Касаи, было обнаружено, что неэффективной операция была в случае

наличия вариантов генов *GYPB*, *PABPC1*, *CNN2*, *KRT27*, *BMP8A*, *PRAMEF1*, *OR8U1* в аддитивной модели и генов *PABPC1*, *PRAMEF1* в доминантной. Ген *OR8U1* имел значимую ассоциацию в двух группах пациентов, причем вариант *rs76325618* отвечал за успешный послеоперационный период, а *rs78729591* – за отсутствие положительной динамики. Только наличие двух аллелей варианта гена *CCDC74B* у пациента связано с неэффективностью ПЭ.

Ген интерлейкина-12 был нокаутирован в мышинной модели билиарной атрезии [130], что не увеличило выживаемость модельных особей после ротавирусной инфекции. В сигнальный путь *ИЛ-12* включен ген *CNN2*, вариант которого имел связь с неэффективной ПЭ. Известно, что у пациентов с БА отличается интерлейкиновый профиль в плазме крови [188], в том числе *ИЛ-2* и *ИЛ-15*, сигналинг которых регулирует ген *SOS2*.

Повышенная экспрессия гена *GYPB* ассоциировалась с лучшей выживаемостью у детей с БА [170]. Найденный нами вариант (*rs5862681*) может потенциально нарушать функцию белка и косвенно подтверждать результаты этого исследования.

ВЫВОДЫ

1. Повышение прямой фракции сывороточного билирубина более 17,1 мкмоль/л при отсутствии визуализации или уменьшении просвета желчного пузыря по данным УЗИ, проведенного после 4-часовой голодной паузы, у ребенка на первой неделе жизни являются наиболее чувствительными маркерами билиарной атрезии.

2. Однолетняя выживаемость детей с нативной печенью без показаний к проведению ТП после операции Касаи составила 60,8%, двухлетняя – 44,1%, пятилетняя – 37,7% и 10-летняя – 33,7%. Медиана срока дожития после операции Касаи – $1,6 \pm 0,3$ года, среднее время до проведения ТП – $6,7 \pm 0,8$ лет. Наиболее частыми осложнениями после операции Касаи являются: бактериальный холангит (78,9% через 1 год, 23,3% через 3–5 лет) и портальная гипертензия (34,7% через 1 год, 56,3% через 3–5 лет, 80% через 10 лет).

3. Установлена прямая высокой силы корреляционная связь между степенью фиброза и возрастом на момент проведения биопсии печени ($r_s = 0,805$; $p < 0,001$), индексом APRI ($r_s = 0,827$; $p = 0,001$), а также диаметром печеночной артерии ($r_s = 0,794$; $p = 0,042$). Корреляционная связь между степенью фиброза печени и длиной селезенки была прямой, заметной силы ($r_s = 0,686$; $p = 0,010$). Между индексом резистентности печеночной артерии ($r_s = 0,639$; $p = 0,05$), а также между индексом Допа/Двв ($r_s = 0,683$; $p = 0,047$) была установлена статистически значимая, прямая, заметной силы корреляционная связь. Вероятность выраженности фиброза/цирроза печени увеличивается при значениях индекса APRI $> 1,52$.

4. Полноэкзомный поиск ассоциаций идентифицировал генетические варианты, достоверно отличающие пациентов с БА от контрольных образцов. Наиболее значимая ассоциация с заболеванием в аддитивной и доминантной моделях наследования была выявлена для генетического варианта rs368030585 (ген *LOC105379749*), а в рецессивной модели – для варианта rs201589859 (ген *POTEL*). Наибольший вклад в благоприятный исход операции Касаи вносил вариант

rs200315308 (ген *ANKRD30A*) (аддитивная и доминантная модели). Самые сильные ассоциации с неблагоприятным исходом были показаны для варианта rs5862681 (ген *GYPB*) в аддитивной модели, варианта rs62513923 (ген *PABPC1*) в доминантной модели и для единственного варианта rs2599972 (ген *CCDC74B*) в рецессивной модели.

5. Наличие «рудиментированного» желчного пузыря по данным УЗИ увеличивают шансы эффективности операции Касаи в 3,62 раза (95%-й ДИ 1,09–12,0), увеличение выраженности фиброза печени на 1 балл, оцененная по данным гистологического исследования биоптата печени на момент операции, снижает шансы эффективности операции в 2,2 раза (95%-й ДИ 0,27–0,95), увеличение содержания холестерина, исследованного на 14±3-и сутки п/о на 1 ммоль/л, снижает шансы на эффективность операции в 1,92 раза (95%-й ДИ 0,33–0,81), повышение прямого билирубина, исследованного на 14±3-и сутки п/о на 1 мкмоль/л, снижает шансы на эффективность операции в 1,04 раза (95%-й ДИ 0,94–0,98).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Всем новорожденным показана оценка цвета стула с использованием карты. У детей с желтухой при исследовании билирубина обязательным является определение прямой фракции. Наличие ахолии стула и/или повышение прямой фракции билирубина > 17 мкмоль/л показано проведение УЗИ органов брюшной полости после 4-часовой голодной паузы.

2. Детям после операции Касаи показано динамическое наблюдение с целью раннего выявления и своевременной коррекции: бактериального холангита, портальной гипертензии и других ассоциированных осложнений, а также для определения оптимальных сроков проведения ТП.

3. Детям с БА с целью определения выраженности фиброза/цирроза печени показано исследование индекса APRI и ультразвуковых параметров: длина селезенки, диаметр печеночной артерии, индекс резистентности печеночной артерии, индекс $D_{\text{опа}}/D_{\text{вв}}$.

4. При проведении молекулярно-генетического исследования у детей с подозрением на БА целесообразно исследование варианта rs368030585 (ген *LOC105379749*), rs201589859 (ген *POT1*), ассоциированных с БА. При проведении молекулярно-генетического исследования у детей с БА показано исследование варианта rs200315308 в гене *ANKRD30A*, ассоциированного с благоприятным исходом, а также исследование вариантов: rs5862681 в гене *GYPB*, rs62513923 в гене *PABPC1* и rs2599972 в гене *CCDC74B*, ассоциированных с неблагоприятным исходом операции Касаи.

5. На основании оценки степени выраженности фиброза по данным интраоперационного гистологического исследования биоптата печени, выявления «рудиментированного» желчного пузыря по данным УЗИ до операции, наряду со скоростью снижения прямого билирубина и холестерина в послеоперационном периоде можно с высокой вероятностью предполагать эффективность хирургической коррекции БА.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Проведенное исследование не дает исчерпывающего ответа на все вопросы, связанные с этиологией, диагностикой и определением предикторов эффективности операции Касаи до ее выполнения. Для дальнейшего изучения этиологического фактора развития БА необходимо увеличение опытной выборки пациентов для исключения статистической ошибки, которая зависит от размера выборки. Известно, что исследования, имеющие особое клиническое значение, как правило, основываются на результатах анализа сотен опытных образцов. Более того, использованный нами подход по статистическому анализу данных секвенирования экзона может быть дополнен другими молекулярно-генетическими методиками, исследующими внутриклеточные процессы, например анализ экспрессии и альтернативного сплайсинга генов. Кроме того, кажется важным изучение гипотезы о возможном присутствии постзиготических соматических патогенных вариаций в генах или регуляторных областях, которые предположительно инициируют облитерирующую холангиопатию, с целью ее верификации. Необходимо провести анализ ДНК печеночных тканей, билиарного тракта пациентов, а также геномов их родителей, чтобы получить более полное представление о возможных генетических факторах заболевания. Одним из перспективных направлений для продолжения работы над данной темой является внедрение разработанного алгоритма ранней диагностики во все родовспомогательные учреждения Российской Федерации с целью анализа его эффективности. Более того, остается открытым вопрос о распространенности БА в России, в связи с чем необходимо создание единой базы и реестра детей с данной нозологией. Наряду с этим увеличение объема выборки и проведение дальнейших клинических и молекулярно-генетических исследований позволит отбирать пациентов, которым будет целесообразно проводить ТП без предшествующей ПЭ.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АЛТ – аланин аминотрансфераза

АСТ – аспартат аминотрансфераза

БА – билиарная атрезия

ВПЧ – вирус папилломы человека

ВРВП – варикозное расширение вен пищевода

ГГТ – γ -глутамилтранспептидаза

ЖК – желчные кислоты

ЖП – желчный пузырь

иПСК – индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

МНО – международное нормализованное отношение

ОБ – общий билирубин

ОНП – олигонуклеотидные повторы

ПБ – прямой билирубин

ПГ – портальной гипертензии

ПТИ – протромбиновый индекс

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЭ – портоэнтеростомия

ТВ – тромбиновое время

ТП – трансплантация печени

УЗИ – ультразвуковое исследование

ХС – холестерин

ХЭ – холинэстераза

ЦМВ – цитомегаловирус

ЦП – цирроз печени

ЩФ – щелочная фосфатаза

ЭБВ – вирус Эбштейна-Барр

AGS – Alagille Syndrome (Синдром Алажилля)

APRI – aspartat aminotransferase to platelet ratio index (отношение активности аспаратаминотрансферазы к уровню тромбоцитов)

CNV – copy number variation (исследование числа копий генов)

D_{ВВ} – диаметр воротной вены

D_{опа} – диаметр общей печеночной артерии

D_{опа}/D_{ВВ} – соотношение диаметра общей печеночной артерии к диаметру воротной вены

FXR – farnesoid X receptor (фарнезоид-Х-рецептор)

GWAS – genome-wide association studies (полногеномный поиск ассоциаций)

Hh-сигналинг – hedgehog-сигналинг

KPE – Kasai portoenterostomy (Касаи портоэнтеростомия)

MMP7 – matrix metalloproteinase-7 (матричная металлопротеиназа 7)

PCK1 – phosphoenolpyruvate Carboxykinase 1 (Фосфоенолпируват карбоксикиназа 1)

WES – whole exome sequencing (секвенирование экзома)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Генетические аспекты этиологии билиарной атрезии / М. Х. Исаева, В. А. Белова, Д. О. Коростин [и др.] // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2020. – №. 6. – С. 5–14.
2. Дегтярева, А. В. Дифференциальная диагностика и принципы этиопатогенетического лечения печени и желчных путей у новорожденных и детей раннего возраста : автореф. дис. ... док. мед. наук : 14.00.09 / Дегтярева Анна Владимировна ; Российский государственный медицинский университет. – Москва, 2008. – 46 с.
3. Дифференциальная диагностика врожденных холестатических болезней у детей / Г. В. Волынец, А. И. Хавкин, В. Н. Панфилова [и др.] // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2017. – № 144 (8). – С. 67–74.
4. Клинические проявления билиарной атрезии у новорожденных детей: необходимость скрининговой программы ранней диагностики / А. В. Дегтярева, М. Х. Исаева, Е. А. Филиппова [и др.] // Вопросы детской диетологии. – 2021. – № 5 (19). – С. 46–54.
5. Неалкогольная жировая болезнь печени у детей с ожирением: современные аспекты диагностики и лечения / Т. В. Строкова, Е. А. Павловская, Е. А. Пырьева [и др.] // Вопросы детской диетологии. – 2021. – Т. 19. – № 2. – С. 53–61.
6. Неинвазивные маркеры фиброза и цирроза печени у детей с билиарной атрезией / М. Х. Исаева, А. В. Дегтярёва, Е. А. Филлипова [и др.] // Вопросы детской диетологии. – 2022. – № 4 (20). – С. 31–41.
7. Отдаленные результаты лечения детей с билиарной атрезией / А. Ю. Разумовский, А. В. Дегтярева, Н. В. Куликова [и др.] // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2019. – Т. 64. – № 1. – С. 46–55.
8. Ранние клинические проявления билиарной атрезии у детей / А. В. Дегтярева, М. Х. Исаева, Е.А. Филиппова [и др.] // Материалы форума XXII Всероссийский научно-образовательный форум Мать и Дитя – 2021 (29сентября–1 октября) : сборник тезисов. – Москва : «МЕДИ Экспо», 2021. – С. 117–118.

9. Современный взгляд на происхождение билиарной атрезии / Ю. А. Козлов, В. А. Новожилов, А. А. Распутин [и др.] // *Анналы хирургии*. – 2017. – № 22 (2). – С. 73–80.
10. Трансплантация печени у детей: опыт последних десятилетий, актуальные проблемы и пути их решения / Н. Д. Венцловайте, Н. А. Ефремова, Л. А. Горячева [и др.] // *Детские Инфекции*. – 2020. – № 19 (2). – С. 52–56.
11. Эхографические изменения органов брюшной полости у детей с билиарной атрезией и синдромом Алажилия в течение первых 3 месяцев жизни / Е. А. Филиппова, М. И. Пыков, В. Э. Рычкова [и др.] // *Педиатрия. Приложение к журналу Consilium Medicum*. – 2017. – № 4. – С. 92–96.
12. 2D shear wave elastography combined with age and serum biomarkers prior to kasai surgery predicts native liver survival of biliary atresia infants / G. Wang, H. Chen, X. Xie [et al.] // *Journal of Internal Medicine*. – 2020. – Vol. 288. – № 5. – P. 570–580.
13. A genome-wide association study identifies a susceptibility locus for biliary atresia on 2p16.1 within the gene EFEMP1 / Y. Chen, M. A. Gilbert, C. M. Grochowski [et al.] // *PLoS genetics*. – 2018. – Vol. 14. – № 8.
14. A multicenter study of primary liver transplantation for biliary atresia in Japan / K. Uto, Y. Inomata, S. Sakamoto [et al.] // *Pediatric surgery international*. – 2019. – Vol. 35. – № 11. – P. 1223–1229.
15. A multicenter study of the outcome of biliary atresia in the United States, 1997 to 2000 / B. L. Shneider, M. B. Brown, B. Haber [et al.] // *Journal of Pediatrics*. – 2006. – Vol. 148. – № 4.
16. A periodic comparison of the survival and prognostic factors of biliary atresia after Kasai portoenterostomy: a single-center study in Korea / K. Ihn, Y. Na, I. G. Ho [et al.] // *Pediatric surgery international*. – 2019. – Vol. 35. – № 3. – P. 285–292.
17. Abnormal DNA methylation of ITGAL (CD11a) in CD4+ T cells from infants with biliary atresia / R. Dong, R. Zhao, S. Zheng [et al.] // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2012. – Vol. 417. – № 3. – P. 986–990.
18. Accuracy of Transient Elastography Data Combined With APRI in Detection and Staging of Liver Disease in Pediatric Patients With Cystic Fibrosis / P. J. Lewindon, M.

- V. Puertolas-Lopez, L. E. Ramm [et al.] // *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association.* – 2019. – Vol. 17. – № 12. – P. 2561-2569.e5.
19. Actin and myosin deposition around bile canaliculi: a predictor of clinical outcome in biliary atresia / O. Segawa, T. Miyano, T. Fujimoto [et al.] // *Journal of pediatric surgery.* – 1993. – Vol. 28. – № 6. – P. 851–856.
20. Advances in paediatric gastroenterology / P. K. H. Tam, P. H. Y. Chung, S. D. St. Peter [et al.] // *Lancet.* – 2017. – Vol. 390. – № 10099. – P. 1072–1082.
21. Age Is Not a Criterion in Patient Selection for Kasai Portoenterostomy / P. Ramachandran, M. Safwan, V. Tamizhvanan [et al.] // *Journal of Indian Association of Pediatric Surgeons.* – 2019. – Vol. 24. – № 4. – P. 271–274.
22. Alagille Syndrome Mimicking Biliary Atresia in Early Infancy / T. Dedic, M. Jirsa, R. Keil [et al.] // *PloS one.* – 2015. – Vol.10. – № 11.
23. Araki, S. Vitamin K Deficiency Bleeding in Infancy / S. Araki, A. Shirahata // *Nutrients.* – 2020. – Vol. 12. – № 3.
24. Aspartate aminotransferase to platelet ratio and fibrosis-4 as biomarkers in biopsy-validated pediatric cystic fibrosis liver disease / D. H. Leung, M. Khan, C. G. Minard [et al.] // *Hepatology.* – 2015. – Vol. 62. – № 5. – P. 1576–1583.
25. Aspartate transaminase-to-platelet ratio index is not correlated with severity of fibrosis or survival in children with biliary atresia / R. C. Lind, H. J. Verkade, R. J. Porte [et al.] // *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition.* – 2012. – Vol. 54. – № 5. – P. 698.
26. Assessment of liver fibrosis and cirrhosis by aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index in children with biliary atresia / S. Y. Kim, J. Y. Seok, S. J. Han [et al.] // *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition.* – 2010. – Vol. 51. – № 2. – P. 198–202.
27. Assessment of liver fibrosis by transient elastography in young children with chronic hepatitis B virus infection / Z. Xu, J. Zhao, J. Liu [et al.] // *Hepatology international.* – 2021. – Vol. 15. – № 3. – P. 602–610.

28. Assessment of native liver fibrosis using ultrasound elastography and serological fibrosis indices in children with biliary atresia after the Kasai procedure / J. Hwang, H. M. Yoon, K. M. Kim [et al.] // *Acta radiologica*. – 2021. – Vol. 62. – № 8. – P. 1088–1096.
29. Association between single nucleotide polymorphisms in the ADD3 gene and susceptibility to biliary atresia / S. Zeng, P. Sun, Z. Chen [et al.] // *PloS one*. – 2014. – Vol. 9. – № 10.
30. Association of common variation in ADD3 and GPC1 with biliary atresia susceptibility / M. R. Bai, W. B. Niu, Y. Zhou [et al.] // *Aging*. – 2020. – Vol.12. – № 8. – P. 7163–7182.
31. Association of X-prolyl aminopeptidase 1 rs17095355 polymorphism with biliary atresia in Thai children / S. Kaewkiattiyot, S. Honsawek, P. Vejchapipat [et al.] // *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*. – 2011. – Vol. 41. – № 12. – P. 1249–1252.
32. Atypical morphologic presentation of biliary atresia and value of serial liver biopsies / G. Azar, D. Beneck, B. Lane [et al.] // *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2002. – Vol. 34. – № 2. – P. 212–215.
33. Averbukh, L. D. Evidence for Viral Induction of Biliary Atresia: A Review/ L. D. Averbukh, G. Y. Wu // *Journal of clinical and translational hepatology*. 2018. – Vol. . – 6. – № 4. C. 410–419.
34. Biliary atresia in England and Wales: results of centralization and new benchmark / M. Davenport, E. Ong, K.Sharif [et al.] // *Journal of pediatric surgery*. – 2011. – Vol.46. – № 9. – P. 1689–1694.
35. Biliary atresia in the Netherlands: outcome of patients diagnosed between 1987 and 2008 / W. de Vries, Z. J. de Langen, H. Groen [et al.] // *The Journal of pediatrics*. – 2012. – Vol. 160. – № 4. – P. 638–644.e2.
36. Biliary atresia in twins' population: a retrospective multicenter study in mainland China / Q. Gou, Y. Chen, C. Yu [et al.] // *Pediatric surgery international*. – 2020. – Vol. 36. – № 6. – P. 711–718.

37. Biliary atresia: Indications and timing of liver transplantation and optimization of pretransplant care / S. S. Sundaram, C. L. Mack, A. G. Feldman [et al.] // *Liver Transplantation*. – 2017. – Vol. 23. – № 1. – P. 96–109.
38. Biliary atresia liver histopathological determinants of early post-Kasai outcome / A. H. P. Nguyen, Y. H. T. Pham, G. H. Vu [et al.] // *Journal of pediatric surgery*. – 2021. – Vol. 56. – № 7. – P. 1169–1173.
39. Biliary Atresia Relevant Human Induced Pluripotent Stem Cells Recapitulate Key Disease Features in a Dish / L. Tian, Z. Ye, K. Kafka [et al.] // *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. – 2019. – Vol. 68. – № 1. – P. 56–63.
40. Biliary atresia screening in Shenzhen: implementation and achievements / J. Zheng, Y. Ye, B. Wang [et al.] // *Archives of disease in childhood*. – 2020. – Vol. 105. – № 8. – P. 720–723.
41. Bilirubin level 1 week after hepatoportoenterostomy predicts native liver survival in biliary atresia / C. Y. Huang, M. H. Chang, H. L. Chen [et al.] // *Pediatric research*. – 2020. – Vol. 87. – № 4. – P. 730–734.
42. Borgeat, M. Newborn biliary atresia screening with the stool colour card: a questionnaire survey of parents / M. Borgeat, S. Korff, B. E. Wildhaber // *BMJ paediatrics open*. – 2018. – Vol. 2. – № 1.
43. Brahee, D. D. Neonatal diagnosis of biliary atresia: a practical review and update / D. D. Brahee, B. S. Lampl // *Pediatric radiology*. – 2022. – Vol. 52. – № 4. – P. 685–692.
44. Bravo, A. A. Liver biopsy / A. A. Bravo, S. G. Sheth, S. Chopra // *The New England journal of medicine*. – 2001. – Vol. 344. – № 7. – P. 495–500.
45. cAMP response element-binding protein (CREB) is required for epidermal growth factor (EGF)-induced cell proliferation and serum response element activation in neural stem cells isolated from the forebrain subventricular zone of adult mice / H. Iguchi, T. Mitsui, M. Ishida [et al.] // *Endocrine journal*. – 2011. – Vol. 58. – № 9. – P. 747–759.
46. CAR and PXR agonists stimulate hepatic bile acid and bilirubin detoxification and elimination pathways in mice / M. Wagner, E. Halilbasic, H. U. Marschall [et al.] // *Hepatology*. – 2005. – Vol. 42. – № 2. – P. 420–430.

47. CD177+ cells produce neutrophil extracellular traps that promote biliary atresia / R. Zhang, L. Su, M. Fu [et al.] // *Journal of hepatology*. – 2022. – Vol. 77. – № 5. – P. 1299–1310.
48. Clinical and pathological features of patients with biliary atresia who survived for more than 5 years with native liver / S. Sun, S. Zheng, X. Lu [et al.] // *Pediatric surgery international*. – 2018. – Vol. 34. – № 4. – P. 381–386.
49. Common genetic variants of GPC1 gene reduce risk of biliary atresia in a Chinese population / J. Ke, S. Zeng, J. Mao [et al.] // *Journal of pediatric surgery*. – 2016. – Vol. 51. – № 10. – P. 1661–1664.
50. Common genetic variants regulating ADD3 gene expression alter biliary atresia risk / G. Cheng, C. S. M. Tang, E. H. M. Wong [et al.] // *Journal of hepatology*. – 2013. – Vol. 59. – № 6. – P. 1285–1291.
51. Comparison of biliary atresia with and without intracranial hemorrhage / Y. Takahashi, T. Matsuura, K. Yoshimaru [et al.] // *Journal of pediatric surgery*. – 2018. – Vol. 53. – № 11. – P. 2245–2249.
52. Complementary functions of the flippase ATP8B1 and the floppase ABCB4 in maintaining canalicular membrane integrity / A. Groen, M. R. Romero, C. Kunne [et al.] // *Gastroenterology*. – 2011. – Vol. 141. – № 5. – P. 1927-1937.e4.
53. Cottrell, G. S. Protease-activated receptors: the role of cell-surface proteolysis in signalling / G. S. Cottrell, A. M. Coelho, N. W. Bunnett // *Essays in biochemistry*. – 2002. – № 38. – P. 169–183.
54. Cytomegalovirus-associated biliary atresia: An aetiological and prognostic subgroup / A. Zani, A. Quaglia, N. Hadzić [et al.] // *Journal of pediatric surgery*. – 2015. – Vol. 50. – № 10. – P. 1739–1745.
55. Detection of Cytomegalovirus Infection in Infants with Biliary Atresia: A Meta-analysis / S. O. O. Mohamed, A.B. E. Elhassan, I. H. E. Elkhidir [et al.] // *Avicenna journal of medicine*. – 2021. – Vol. 12. – № 1. – P. 003–009.
56. Determining the optimal timing of liver transplant for pediatric patients after Kasai portoenterostomy based on disease severity scores / P. H. Y. Chung, K. S. H. Chok, K.

- K. Y. Wong [et al.] // *Journal of pediatric surgery*. – 2020. – Vol. 55. – № 9. – P. 1892–1896.
57. Development and Assessment of Screening Nomogram for Biliary Atresia Based on Hepatobiliary Ultrasonographic Features / S. Y. Dai, Y. Q. Sun, Y. Wu [et al.] // *Frontiers in Pediatrics*. – 2021. – №9.
58. Diagnostic Yield of Newborn Screening for Biliary Atresia Using Direct or Conjugated Bilirubin Measurements / S. Harpavat, J. A. Garcia-Prats, C. Anaya [et al.] // *JAMA*. – 2020. – Vol. 323. – № 12. – P. 1141–1150.
59. Dong, R. Changes in epigenetic regulation of CD4+ T lymphocytes in biliary atresia / R. Dong, R. Zhao, S. Zheng // *Pediatric research*. – 2011. – Vol. 70. – № 6. – P. 555–559.
60. DNA hypomethylation causes bile duct defects in zebrafish and is a distinguishing feature of infantile biliary atresia / R. P. Matthews, S. F. Eauc Claire, M. Mugnie [et al.] // *Hepatology*. – 2011. – Vol. 53. – № 3. – P. 905–914.
61. Doppler assessment of children with liver cirrhosis and portal hypertension in comparison with a healthy control group: An analytical cross-sectional study / M. Riahinezhad, M. Rezaei, H. Saneian [et al.] // *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*. – 2018. – Vol. 23. – № 5.
62. Downregulation of microRNA-145 may contribute to liver fibrosis in biliary atresia by targeting ADD3 / Y. Ye, Z. Li, Q. Feng [et al.] // *PloS one*. – 2017. – Vol. 12. – № 9.
63. Durkin, N. Prematurity and biliary atresia: a 30-year observational study / N. Durkin, M. Deheragoda, M. Davenport // *Pediatric surgery international*. – 2017. – Vol. 33. – № 12. – P. 1355–1361.
64. Early US findings of biliary atresia in infants younger than 30 days / S. M. Hwang, T. Y. Jeon, S. Y. Yoo [et al.] // *European radiology*. – 2018. – Vol. 28. – № 4. – P. 1771–1777.
65. Effect of Adjuvant Steroid Therapy in type 3 Biliary Atresia / X. Lu, J. Jiang, Z. Shen [et al.] // *Annals of Surgery*. 2022.

66. Effects of postoperative adjuvant steroid therapy on the outcomes of biliary atresia: A systematic review and updated meta-analysis / C. Z. Yang, Y. Zhou, M. Ke [et al.] // *Frontiers in Pharmacology*. – 2022. – Vol. 13.
67. Effects of the infant stool color card screening program on 5-year outcome of biliary atresia in Taiwan / T. H. Lien, M. H. Chang, J. F. Wu [et al.] // *Hepatology*. – 2011. – Vol. 53. – № 1. – P. 202–208.
68. EFSUMB Guidelines and Recommendations on the Clinical Use of Liver Ultrasound Elastography, Update 2017 (Long Version) / C. F. Dietrich, J. Bamber, A. Berzigotti [et al.] // *Ultraschall in der Medizin*. – 2017. – Vol. 38. – № 4. – P. e16–e47.
69. Epidemiological features of biliary atresia in Taiwan, a national study 1996-2003 / M. M. Tiao, S. S. Tsai, H. W. Kuo [et al.] // *Journal of gastroenterology and hepatology*. – 2008. – Vol. 23. – № 1. – P. 62–66.
70. Everhart, J. E. Management of hepatitis C: A National Survey of Gastroenterologists and Hepatologists / J. E. Everhart, M. Stolar, J. H. Hoofnagle // *Hepatology*. – 1997. – Vol. 26. – № 3. P. 78S – 82S.
71. Evidence from human and zebrafish that GPC1 is a biliary atresia susceptibility gene / S. Cui, E. A. Tsai, S. F. EauClaire [et al.] // *Gastroenterology*. – 2013. – Vol. 144. – № 5.
72. Exome Sequencing in Individuals with Isolated Biliary Atresia / R. Rajagopalan, E. A. Tsai, C. M. Grochowski [et al.] // *Scientific reports*. – 2020. – Vol. 10. – № 1.
73. Expression analysis of the human adducin gene family and evidence of ADD2 β 4 multiple splicing variants / L. Citterio, L. Tizzoni, M. Catalano [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2003. – Vol. 309. – № 2. – P. 359–367.
74. Expression of hepatocyte transporters and nuclear receptors in children with early and late-stage biliary atresia / H. L. Chen, Y. J. Liu, H. L. Chen [et al.] // *Pediatric research*. – 2008. – Vol. 63. – № 6. – P. 667–673.
75. Fabre, A. Somatic mutation, a cause of biliary atresia: A hypothesis / A. Fabre, C. Roman, B. Roquelaure // *Medical hypotheses*. – 2017. – №102. – P. 91–93.

76. Factors Influencing Time-to-diagnosis of Biliary Atresia / S. Harpavat, P. J. Lupo, L. Liwanag [et al.] // *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. – 2018. – Vol. 66. – № . – P. 850–856.
77. Feldman, A. G. Neonatal cholestasis: emerging molecular diagnostics and potential novel therapeutics / A. G. Feldman, R. J. Sokol // *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. –2019. – Vol. 16. – № 6. – C. 346–360.
78. Fibulin-3 promotes glioma growth and resistance through a novel paracrine regulation of Notch signaling / B. Hu, M. S. Nandhu, H. Sim [et al.] // *Cancer research*. – 2012. – Vol. 72. – № 15. – P. 3873–3885.
79. Fibulins: a versatile family of extracellular matrix proteins / R. Timpl, T. Sasaki, G. Kostka [et al.] // *Nature reviews. Molecular cell biology*. – 2003. – Vol. 4. – № 6. – P. 479–489.
80. Five-year native liver survival analysis in biliary atresia from a single large Chinese center: The death/liver transplantation hazard change and the importance of rapid early clearance of jaundice / Z. Wang, Y. Chen, C. Peng [et al.] // *Journal of Pediatric Surgery*. – 2019. – Vol. 54. – № 8. – P. 1680–1685.
81. Foxp3 promoter methylation impairs suppressive function of regulatory T cells in biliary atresia / K. Li, X. Zhang, L. Yang [et al.] // *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*. – 2016. – Vol. 311. – № 6. – P. G989–G997.
82. Genome-wide association studies in biliary atresia / M. Ningappa, J. Min, B. W. Higgs [et al.] // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. – 2015. – Vol. 7. – № 5. – P. 267–273.
83. Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for biliary atresia on 10q24.2 / M. M. Garcia-Barceló, M. Y. Yeung, X. P. Miao [et al.] // *Human molecular genetics*. – 2010. – Vol. 19. – № 14. – P. 2917–2925.
84. Genomic alterations in biliary atresia suggest region of potential disease susceptibility in 2q37.3 / M. Leyva-Vega, J. Gerfen, B. D. Thiel [et al.] // *American journal of medical genetics. Part A*. – 2010. – Vol. 152A. – № 4. – P. 886–895.

85. GEP100/Arf6 is required for epidermal growth factor-induced ERK/Rac1 signaling and cell migration in human hepatoma HepG2 cells / Z. Z. Hu, J. Du, L. Yang [et al.] // *PloS one*. – 2012. – Vol. 7. – № 6.
86. Girard, M. Genetics in biliary atresia / M. Girard, G. Panasyuk // *Current opinion in gastroenterology*. – 2019. – Vol. 35. – № 2. – P. 73–81.
87. Global methylation, oxidative stress, and relative telomere length in biliary atresia patients / W. Udomsinprasert, N. Kitkumthorn, A. Mutirangura [et al.] // *Scientific reports*. – 2016. – Vol. 6.
88. Glutathione antioxidant pathway activity and reserve determine toxicity and specificity of the biliary toxin biliatresone in zebrafish / X. Zhao, K. Lorent, B. J. Wilkins [et al.] // *Hepatology*. – 2016. – Vol. 64. – № 3. – P. 894–907.
89. Goodhue, C. Newborn screening for biliary atresia in the United States / C. Goodhue, M. Fenlon, K. S. Wang // *Pediatric surgery international*. – 2017. – Vol. 33. – № 12. – P. 1315–1318.
90. Grieve, A. Aspartate Aminotransferase-to-Platelet ratio index (APRI) in infants with biliary atresia: prognostic value at presentation / A. Grieve, E. Makin, M. Davenport // *Journal of pediatric surgery*. – 2013. – Vol. 48. – № 4. – P. 789–795.
91. Guideline for the Evaluation of Cholestatic Jaundice in Infants: Joint Recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition and the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition / R. Fawaz, U. Baumann, U. Ekong [et al.] // *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. – 2017. – Vol. 64. – № 1. – P. 154–168.
92. Guyot, C. Interaction of bile salts with rat canalicular membrane vesicles: evidence for bile salt resistant microdomains / C. Guyot, B. Stieger // *Journal of hepatology*. – 2011. – Vol. 55. – № 6. – P. 1368–1376.
93. Harpavat, S. Patients with biliary atresia have elevated direct/conjugated bilirubin levels shortly after birth / S. Harpavat, M. J. Finegold, S. J. Karpen // *Pediatrics*. – 2011. – Vol. 128. – № 6.

94. Hepatic arterial diameter measured with US: adjunct for US diagnosis of biliary atresia / S. K. Woo, J. E. Cheon, B. J. Youn [et al.] // *Radiology*. – 2007. – Vol. 245. – № 2. – P. 549–555.
95. Hepatic Subcapsular Flow as a Significant Diagnostic Marker for Biliary Atresia: A Meta-Analysis / C. Sun, B. Wu, J. Pan [et al.] // *Disease markers*. – 2020. – Vol. 2020.
96. High prevalence of alpha-1-antitrypsin heterozygosity in children with chronic liver disease / K. M. Campbell, G. Arya, F. C. Ryckman [et al.] // *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. – 2007. – Vol. 44. – № 1. – P. 99–103.
97. HLA and cytokine gene polymorphisms in biliary atresia / P. T. Donaldson, M. Clare, P. K. Constantini [et al.] // *Liver*. – 2002. – Vol. 22. – № 3. – P. 213–219.
98. Home-based color card screening for biliary atresia: the first steps for implementation of a nationwide newborn screening in Germany / O. Madadi-Sanjani, J. Blaser, G. Voigt [et al.] // *Pediatric surgery international*. – 2019. – Vol. 35 – № 11. – P. 1217–1222.
99. Hopkins, P. C. Incidence of Biliary Atresia and Timing of Hepatopertoenterostomy in the United States / P. C. Hopkins, N. Yazigi, C. M. Nylund // *The Journal of pediatrics*. – 2017. – № 187. – P. 253–257.
100. Hoving, J. C. Signalling C-type lectin receptors, microbial recognition and immunity / J. C. Hoving, G. J. Wilson, G. D. Brown // *Cellular microbiology*. – 2014. – Vol. 16. – № 2. – P. 185–194.
101. Human kininogen gene is transactivated by the farnesoid X receptor / A. Zhao, J. L. Lew, L. Huang [et al.] // *The Journal of biological chemistry*. – 2003. – Vol. 278. – № 31. – P. 28765–28770.
102. Human leukocyte antigens in Japanese patients with biliary atresia: retrospective analysis of patients who underwent living donor liver transplantation / T. Yuasa, H. Tsuji, S. Kimura [et al.] // *Human immunology*. – 2005. – Vol. 66. – № 3. – P. 295–300.
103. Identification of a plant isoflavonoid that causes biliary atresia / K. Lorent, W. Gong 1, K. A. Koo [et al.] // *Science translational medicine*. – 2015. – Vol. 7. – № 286.

104. Identification of a wide spectrum of ciliary gene mutations in nonsyndromic biliary atresia patients implicates ciliary dysfunction as a novel disease mechanism / W. Y. Lam, C. S. M. Tang, M. T. So [et al.] // *EBioMedicine*. – 2021. – Vol. 71.
105. Immunohistochemical localization of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase in normal human placental, fetal and adult tissues / T. Nagasaka, S. Nomura, M. Okamura [et al.] // *Reproduction, fertility, and development*. – 1997. – Vol. 9. – № 8. – P. 747–753.
106. Impact of the Kasai Procedure and the Length of Native Liver Survival Time on Outcomes of Liver Transplantation for Biliary Atresia / L. Liu, L. Wei, W. Qu [et al.] // *Liver Transplantation*. – 2022. – Vol. 28. – № 2. – C. 224–235.
107. Impaired Redox and Protein Homeostasis as Risk Factors and Therapeutic Targets in Toxin-Induced Biliary Atresia / X. Zhao, K. Lorent, D. Escobar-Zarate [et al.] // *Gastroenterology*. – 2020. – Vol. 159. – № 3. – P. 1068-1084.e2.
108. Incidence of hepatotropic viruses in biliary atresia / S. Rauschenfels, M. Krassmann, A. N. Al-Masri [et al.] // *European journal of pediatrics*. – 2009. – Vol. 168. – № 4. – P. 469–476.
109. Infant Stool Color Card Screening Helps Reduce the Hospitalization Rate and Mortality of Biliary Atresia: A 14-Year Nationwide Cohort Study in Taiwan / M. Lee, S. C. C. Chen, H. Y. Yang [et al.] // *Medicine*. – 2016. – Vol. 95. – № 12.
110. Inflammation mediated down-regulation of hepatobiliary transporters contributes to intrahepatic cholestasis and liver damage in murine biliary atresia / H. Yang, T. Plösch, T. Lisman [et al.] // *Pediatric research*. – 2009. – Vol. 66. – № 4. – P. 380–385.
111. Innate Immunity and Pathogenesis of Biliary Atresia / A. Ortiz-Perez, B. Donnelly, H. Temple [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – № 11. – P. 329.
112. Jaundice revisited: recent advances in the diagnosis and treatment of inherited cholestatic liver diseases / H. L. Chen, S. H. Wu, S. H. Hsu [et al.] // *Journal of biomedical science*. – 2018. – Vol. 25. – № 1.
113. Kasai Procedure in Patients Older Than 90 Days: Worth a Cut / M. Uecker, J. F. Kuebler, N. Schukfeh [et al.] // *European journal of pediatric surgery : official journal of Austrian Association of Pediatric Surgery*. – 2022. – Vol. 32. – № 1. – P.80–84.

114. Keppler, D. The roles of MRP2, MRP3, OATP1B1, and OATP1B3 in conjugated hyperbilirubinemia / D. Keppler // *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. – 2014. – Vol. 42. – № 4. – C. 561–565.
115. Khayat, A. Outcomes of late Kasai portoenterostomy in biliary atresia: a single-center experience / A. Khayat, A. M. Alamri, O. I. Saadah // *Journal of International Medical Research*. – 2021. – Vol. 49. – № 5.
116. Lack of HLA predominance and HLA shared epitopes in biliary Atresia / C. L. Mack, K. M. Anderson, M. T. Aubrey [et al.] // *SpringerPlus*. – 2013. – Vol. 2. – № 1. – P. 1–13.
117. Lakshminarayanan, B. Biliary atresia: A comprehensive review / B. Lakshminarayanan, M. Davenport // *Journal of autoimmunity*. – 2016. – Vol. 73. – P. 1–9.
118. Landing, B. H. Time course of the intrahepatic lesion of extrahepatic biliary atresia: a morphometric study / B. H. Landing, T. R. Wells, E. Ramicone // *Pediatric pathology*. – 1985. – Vol. 3–4. – № 4. – P. 309–319.
119. Laochareonsuk, W. Single nucleotide polymorphisms within Adducin 3 and Adducin 3 antisense RNA1 genes are associated with biliary atresia in Thai infants / W. Laochareonsuk, P. Chiengkriwate, S. Sangkhathat // *Pediatric surgery international*. – 2018. – Vol. 34. – № 5. – P. 515–520.
120. Latest diagnostic performance of different ultrasonic features for biliary atresia / P. Yang, Y. Tang, H. Wang [et al.] // *Acta radiologica*. – 2022. – Vol. 63. – № 12. – P. 1593–1602.
121. Li, H. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data / H. Li // *Bioinformatics*. – 2011. – Vol. 27. – № 21. – P. 2987–2993.
122. Li, H. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform / H. Li, R. Durbin // *Bioinformatics*. – 2009. – Vol. 25. – № 14. – P. 1754–1760.
123. Linton, K. J. Lipid flopping in the liver / K. J. Linton // *Biochemical Society transactions*. – 2015. – Vol. 43. – № 5. – P. 1003–1010.

124. Liu, F. The outcome of Kasai portoenterostomy after day 70 of life / F. Liu, F. Yeung, P. H. Y. Chung // *Frontiers in Pediatrics*. – 2022. – Vol. 10.
125. Liver fibrosis staging with combination of APRI and FIB-4 scoring systems in chronic hepatitis C as an alternative to transient elastography / N. Papadopoulos, S. Vasileiadi, M. Papavdi [et al.] // *Annals of gastroenterology*. – 2019. – Vol. 32. – № 5. – P. 498–503.
126. Liver Transplantation for Biliary Atresia: Is There a Difference in Outcome for Infants? / R. Arnon, J. Chu, R. A. Annunziato [et al.] // *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. – 2016. – Vol. 62. – № 2. – P. 220–225.
127. Liver Ultrasound Elastography: An Update to the World Federation for Ultrasound in Medicine and Biology Guidelines and Recommendations / G. Ferraioli, V. W. S. Wong, L. Castera [et al.] // *Ultrasound in medicine & biology*. – 2018. – Vol. 44. – № 12. – P. 2419–2440.
128. Long-term follow-up of biliary atresia using liver transient elastography / F. Yeung, A. C. H. Fung, P. H. Y. Chung [et al.] // *Pediatric surgery international*. – 2022. – Vol. 38. – № 7. – P. 1013–1018.
129. Long-term outcomes of biliary atresia patients surviving with their native livers / M. Hukkinen, S. Ruuska, M. Pihlajoki [et al.] // *Best practice and research : Clinical gastroenterology*. – 2022. – Vol. 56–57.
130. Loss of interleukin-12 modifies the pro-inflammatory response but does not prevent duct obstruction in experimental biliary atresia / S. K. Mohanty, P. Shivakumar, G. Sabla [et al.] // *BMC gastroenterology*. – 2006. – Vol. 6.
131. Luoto, T. T. Evolving management of paediatric portal hypertension / T. T. Luoto, M. P. Pakarinen // *Archives of disease in childhood*. – 2021. – Vol. 106. – № 10. – P. 939–940.
132. Machine Learning Evaluation of Biliary Atresia Patients to Predict Long-Term Outcome after the Kasai Procedure / M. Caruso, C. Ricciardi, G. D. Paoli [et al.] // *Bioengineering (Basel, Switzerland)*. – 2021. – Vol. 8. – № 11.

133. Makishima, M. Nuclear receptors as targets for drug development: regulation of cholesterol and bile acid metabolism by nuclear receptors / M. Makishima // *Journal of pharmacological sciences*. – 2005. – Vol. 97. – № 2. – P. 177–183.
134. Management of Biliary Atresia in France 1986 to 2015: Long-term Results / M. Fanna, G. Masson, C. Capito [et al.] // *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. – 2019. – Vol. 69. – № 4. – P. 416–424.
135. Management of biliary atresia: To transplant or not to transplant / C. D. Kakos, I. A. Ziogas, S. P. Alexopoulos [et al.] // *World Journal of Transplantation*. – 2021. – Vol. 11. – № 9. – P. 400.
136. Methylation Microarray Studies Highlight PDGFA Expression as a Factor in Biliary Atresia / Z. C. Cofer, S. Cui, C. Kim [et al.] // *PloS one*. – 2016. – Vol. 11. – № 3.
137. Mezina, A. Whole Exome Sequencing Identifies ABCB4 Gene Variants As Modifiers of Biliary Atresia Outcomes / A. Mezina // *Gastroenterology*. – 2014. – Vol. 146. – № 5.
138. MicroRNA-29b/142-5p contribute to the pathogenesis of biliary atresia by regulating the IFN- γ gene / Y. Yang, Z. Jin, R. Dong [et al.] // *Cell death and disease*. – 2018. – Vol. 9. – № 5. – P. 545.
139. Miethke, A. G. Fishing for biliary atresia susceptibility genes / A. G. Miethke, S. S. Huppert // *Gastroenterology*. – 2013. – Vol. 144. – № 5. – P. 878–881.
140. Mother-to-daughter occurrence of biliary atresia: a case report / K. Kobayashi, M. Kubota, N. Okuyama [et al.] // *Journal of pediatric surgery*. – 2008. – Vol. 43. – № 8. – P. 1566–1568.
141. Native liver histology after successful portoenterostomy in biliary atresia / H. Lampela, S. Kosola, P. Heikkilä [et al.] // *Journal of clinical gastroenterology*. – 2014. – Vol. 48. – № 8. – P. 721–728.
142. Neonatal Jaundice / B. Ansong-Assoku, S. D. Shah, M. Adnan [et al.] // *Alzheimer's and Dementia: Diagnosis, Assessment and Disease Monitoring*. – 2022. – Vol. 13. – № 3. – P. 1–4.

143. Newborn Direct or Conjugated Bilirubin Measurements As a Potential Screen for Biliary Atresia / S. Harpavat, R. Ramraj, M. J. Finegold [et al.] // *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. – 2016. – Vol. 62. – № 6. – P. 799–803.
144. Newborn Screening for Biliary Atresia: A Review of Current Methods / T. Rabbani, S. L. Guthery, R. Himes [et al.] // *Current gastroenterology reports*. – 2021. – Vol. 23. – № 12. – P. 28.
145. Nio, M. Japanese Biliary Atresia Registry / M. Nio // *Pediatric surgery international*. – 2017. – Vol. 33. – № 12. – P. 1319–1325.
146. Non-invasive diagnosis of liver fibrosis and cirrhosis / Y. Lurie, M. Webb, R. Cytter-Kuint [et al.] // *World journal of gastroenterology*. – 2015. – Vol. 21. – № 41. – P. 11567–11583.
147. Non-Invasive Predictors for the First Variceal Hemorrhage in Children With Biliary Atresia After Kasai Portoenterostomy / F. K. Chiou, C. Ong, Y. Low [et al.] // *Journal of clinical and experimental hepatology*. – 2019. – Vol. 9. – № 5. – P. 581–587.
148. Nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor ameliorate cholestatic liver injury / C. A. M. Stedman, C. Liddle, S. A. Coulter [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2005. – Vol. 102. – № 6. – P. 2063–2068.
149. Optimizing the US Diagnosis of Biliary Atresia with a Modified Triangular Cord Thickness and Gallbladder Classification / L. Y. Zhou, W. Wang, Q. Y. Shan [et al.] // *Radiology*. – 2015. – Vol. 277. – № 1. – C. 181–191.
150. Oshio, C. Contractility of bile canaliculi: implications for liver function / C. Oshio, M. J. Phillips // *Science*. – 1981. – Vol. 212. – № 4498. – P. 1041–1042.
151. Outcome after portoenterostomy in biliary atresia: pivotal role of degree of liver fibrosis and intensity of stellate cell activation / E. Shteyer, G. A. Ramm, C. Xu [et al.] // *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. – 2006. – Vol. 42. – № 1. – P. 93–99.
152. Outcomes of biliary atresia in the Nordic countries - a multicenter study of 158 patients during 2005-2016 / M. P. Pakarinen, L. S. Johansen, J. F. Svensson [et al.] // *Journal of pediatric surgery*. – 2018. – Vol. 53. – № 8. – P. 1509–1515.

153. Outcomes of biliary atresia splenic malformation (BASM) syndrome following Kasai operation: a systematic review and meta-analysis / X. Xu, R. Dou, S. Zhao [et al.] // *World journal of pediatric surgery*. – 2022. – Vol. 5. – № 3. – e000346.
154. PDGFA gene rs9690350 polymorphism increases biliary atresia risk in Chinese children / F. Liu, J. Zeng, D. Zhu [et al.] // *Bioscience reports*. – 2020. – Vol. 40. – № 7.
155. Perioperative Complications after Kasai Hepatoportoenterostomy: Data from the Swiss National Biliary Atresia Registry / A. M. Calinescu, J. C. H. Wilde, S. Korff [et al.] // *European journal of pediatric surgery*. – 2020. – Vol. 30. – № 4. – C. 364–370.
156. Peri-Operative Liver Fibrosis and Native Liver Survival in Pediatric Patients with Biliary Atresia: A Systematic Review and Meta-Analysis / A. Jahangirnia, I. Oltean, Y. Nasr [et al.] // *Pediatric gastroenterology, hepatology and nutrition*. – 2022. – Vol. 25. – № 5. – P. 353–375.
157. Petersen, C. Aetiology of biliary atresia: what is actually known? / C. Petersen, M. Davenport // *Orphanet journal of rare diseases*. – 2013. – Vol. 8. – № 1.
158. Phosphoinositide 3-kinase inhibitors protect mouse kidney cells from cyclosporine-induced cell death / E. Sarró, O. Tornavaca, M. Plana [et al.] // *Kidney international*. – 2008. – Vol. 73. – № 1. – P. 77–85.
159. Portal plate bile duct diameter in biliary atresia is associated with long-term outcome / M. Shpoliansky, A. Tobar, Y. Mozer-Glassberg [et al.] // *Pediatric surgery international*. – 2022. – Vol. 38. – № 6. – P. 825–831.
160. Practical approach for the diagnosis of biliary atresia on imaging, part 2: magnetic resonance cholecystopancreatography, hepatobiliary scintigraphy, percutaneous cholecysto-cholangiography, endoscopic retrograde cholangiopancreatography, percutaneous liver biopsy, risk scores and decisional flowchart / M. Napolitano, S. Franchi-Abella, M. B. Damasio [et al.] // *Pediatric Radiology*. – 2021. – Vol. 51. – № 8. – P. 1545–1554.
161. Practical approach to imaging diagnosis of biliary atresia, Part 1: prenatal ultrasound and magnetic resonance imaging, and postnatal ultrasound / M. Napolitano, S. Franchi-Abella, M. B. Damasio [et al.] // *Pediatric radiology*. – 2021. – Vol. 51. – № 2. – P. 314–331.

162. Predictors of Need for Liver Transplantation in Children Undergoing Hepatopertoenterostomy for Biliary Atresia / G. Ramos-Gonzalez, S. Elisofon, E. C. Dee [et al.] // *Journal of Pediatric Surgery*. – 2019. – Vol. 54. – № 6. – P. 1127–1131.
163. Predictors of Successful Kasai Portoenterostomy and Survival with Native Liver at 2 Years in Infants with Biliary Atresia / R. Kumar, B. B. Lal, V. Sood [et al.] // *Journal of clinical and experimental hepatology*. – 2019. – Vol. 9. – № 4. – P. 453–459.
164. Preoperative alkaline phosphatase is a potential predictor of short-term outcome of surgery in infants with biliary atresia / S. A. W. Abdel-Aziz, M. M. Sira, E. H. Gad [et al.] // *Clinical and experimental hepatology*. – 2019. – Vol. 5. – № 2. – P. 155–160.
165. Preoperative risk factors for the early failure of the Kasai portoenterostomy in patients with biliary atresia / M. A. Capparelli, V. H. Ayarzabal, E. T. Halac [et al.] // *Pediatric surgery international*. – 2021. – Vol. 37. – № 9. – P. 1183–1189.
166. Prognosis of Children Undergoing Liver Transplantation: A 30-Year European Study / U. Baumann, V. Karam, R. Adam [et al.] // *Pediatrics*. – 2022. – Vol. 150. – № 4.
167. Prognostic accuracy of FIB-4, NAFLD fibrosis score and APRI for NAFLD-related events: A systematic review / J. Lee, Y. Vali, J. Boursier [et al.] // *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. – 2021. – Vol. 41. – № 2. – P. 261–270.
168. Prolonged neonatal jaundice and the diagnosis of biliary atresia: a single-center analysis of trends in age at diagnosis and outcomes / S. I. Wadhwani, Y. P. Turmelle, R. Nagy [et al.] // *Pediatrics*. – 2008. – Vol. 121. – № 5. – P. 1438–1440.
169. Province-wide Biliary Atresia Home Screening Program in British Columbia: Evaluation of First 2 Years / J. P. Woolfson, R. A. Schreiber, A. E. Butler [et al.] // *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. – 2018. – Vol. 66. – № 6. – P. 845–849.
170. Regulation of bile duct epithelial injury by hepatic CD71+ erythroid cells / L. Yang, P. Shivakumar, J. Kinder [et al.] // *JCI insight*. – 2020. – Vol. 5. – № 11.
171. Relevant factors for early liver transplantation after Kasai portoenterostomy / L. Ge, J. Zhan, W. Gao [et al.] // *BMC Pediatrics*. – 2020. – Vol. 20. – № 1. – P. 1–7.

172. Remote results of treatment of biliary atresia in children / A. Y. Razumovskiy, A. V. Degtyareva, N. V. Kulikova [et al.] // *Rossiyskiy Vestnik Perinatologii i Pediatrii*. – 2019. – Vol. 64. – № 1. – P. 46–55.
173. Replication of a GWAS signal in a Caucasian population implicates ADD3 in susceptibility to biliary atresia / E. A. Tsai, C. M. Grochowski, K. M. Loomes [et al.] // *Human genetics*. – 2014. – Vol. 133. – № 2. – P. 235–243.
174. RNA-seq reveals outcome-specific gene expression of MMP7 and PCK1 in biliary atresia / P. Ramachandran, D. Balamurali, J. J. Peter [et al.] // *Molecular biology reports*. – 2019. – Vol. 46. – № 5. – P. 5123–5130.
175. Risk Estimation for Biliary Atresia in Patients with Neonatal Cholestasis: Development and Validation of a Risk Score / J. R. Kim, J. Y. Hwang, H. M. Yoon [et al.] // *Radiology*. – 2018. – Vol. 288. – № 1. – P. 262–269.
176. Rock, N. Liver involvement in children with ciliopathies / N. Rock, V. McLin // *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*. – 2014. – Vol. 38. – № 4. – P. 407–414.
177. Role of farnesoid X receptor in determining hepatic ABC transporter expression and liver injury in bile duct-ligated mice / M. Wagner, P. Fickert, G. Zollner [et al.] // *Gastroenterology*. – 2003. – Vol. 125. – № 3. – P. 825–838.
178. Sasaki, H. Current management of long-term survivors of biliary atresia: over 40 years of experience in a single center and review of the literature / H. Sasaki, H. Tanaka, M. Nio // *Pediatric Surgery International*. – 2017. – Vol. 33. – № 12. – P. 1327–1333.
179. Schreiber, R. A. Newborn Screening for Biliary Atresia / R. A. Schreiber // *JAMA*. – 2020. – Vol. 323. – № 12. – P. 1137–1138.
180. Serial ultrasound findings associated with early liver transplantation after Kasai portoenterostomy in biliary atresia / T. Y. Jeon, S. Y. Yoo, J. H. Kim [et al.] // *Clinical radiology*. – 2013. – Vol. 68. – № 6. – P. 588–594.
181. Sharma, J. N. Hypertension and the bradykinin system / J. N. Sharma // *Current hypertension reports*. – 2009. – Vol. 11. – № 3. – P. 178–181.

182. Shear wave elastography for evaluation of the urgency of liver transplantation in pediatric patients with biliary atresia / L. H. Gu, G. X. Gu, H. Fang [et al.] // *Pediatric transplantation*. – 2020. – Vol. 24. – № 8.
183. Sonography-guided percutaneous liver biopsies in children / P. Govender, M. M. Jonas, A. I. Alomari [et al.] // *AJR. American journal of roentgenology*. – 2013. – Vol. 201. – № 3. – P. 645–650.
184. Soufi, N. Post-Transplant Disease Recurrence in Pediatric PSC / N. Soufi, F. Bazerbachi, M. Deneau // *Current gastroenterology reports*. – 2018. – Vol. 20. – № 9.
185. Supersonic shear-wave elastography and APRI for the detection and staging of liver disease in pediatric cystic fibrosis / D. A. Calvopina, C. Noble, A. Weis [et al.] // *Journal of cystic*. – 2020. – Vol. 19. – № 3. – P. 449–454.
186. Supersonic shearwave elastography in the assessment of liver fibrosis for postoperative patients with biliary atresia / S. Chen, B. Liao, Z. Zhong [et al.] // *Scientific reports*. – 2016. – № 6.
187. System analysis of the sequencing quality of human whole exome samples on BGI NGS platform / V. Belova, A. Pavlova, R. Afasizhev [et al.] // *Scientific reports*. – 2022. – Vol. 12. – № 1.
188. Systemic cytokine profiles in biliary atresia / W. Udomsinprasert, T. Ungsudechachai, P. Vejchapipat [et al.] // *PloS one*. – 2022. – Vol. 17. – № 4.
189. Tan, A. Unified representation of genetic variants / A. Tan, G. R. Abecasis, H. M. Kang // *Bioinformatics*. – 2015. – Vol. 31. – № 13. – P. 2202–2204.
190. Technical standardization of Kasai portoenterostomy for biliary atresia / M. Nio, M. Wada, H. Sasaki [et al.] // *Journal of Pediatric Surgery*. – 2016. – Vol. 51. – № 12. – P. 2105–2108.
191. The anatomic pattern of biliary atresia identified at time of Kasai hepatoportoenterostomy and early postoperative clearance of jaundice are significant predictors of transplant-free survival / R. Superina, J. C. Magee, M. L. Brandt [et al.] // *Annals of surgery*. – 2011. – Vol. 254. – № 4. – P. 577–585.
192. The cytoskeleton of digestive epithelia in health and disease / N. O. Ku, X. Zhou, D. M. Toivola [et al.] // *The American journal of physiology*. – 1999. – Vol. 277. – № 6.

193. The EGFR-GEP100-Arf6-AMAP1 signaling pathway specific to breast cancer invasion and metastasis / H. Sabe, S. Hashimoto, M. Morishige [et al.] // *Traffic*. – 2009. – Vol. 10. – № 8. – P. 982–993.
194. The evolution of early liver biopsy findings in babies with jaundice may delay the diagnosis and treatment of biliary atresia / C. Lemoine, H. Melin-Aldana, K. Brandt [et al.] // *Journal of pediatric surgery*. – 2020. – Vol. 55. – № 5. – P. 866–872.
195. The evaluation of hepatic fibrosis scores in children with nonalcoholic fatty liver disease / S. Mansoor, L. Yerian, R. Kohli [et al.] // *Digestive diseases and sciences*. – 2015. – Vol. 60. – № 5. – P. 1440–1447.
196. The Experience of Using Multipotent Mesenchymal Stromal Cells in the Treatment of Severe Recurrent Cholangitis in Children with Biliary Atresia after Kasai Surgery / A. V. Degtyareva, M. H. Isaeva, D. N. Silachev [et al.] // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2022. – Vol. 174 – № 1. – P. 164–173.
197. The intragenic epistatic association of ADD3 with biliary atresia in Southern Han Chinese population / Z. Wang, X. Xie, J. Zhao [et al.] // *Bioscience reports*. – 2018. – Vol. 38. – № 3.
198. The most reliable early predictors of outcome in patients with biliary atresia after Kasai's operation / T. Goda, H. Kawahara, A. Kubota [et al.] // *Journal of pediatric surgery*. – 2013. – Vol. 48. – № 12. – P. 2373–2377.
199. The Role of ARF6 in Biliary Atresia / M. Ningappa, J. So, J. Glessner [et al.] // *PloS one*. – 2015. – Vol. 10. – № 9.
200. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools / H. Li, B. Handsaker, A. Wysoker [et al.] // *Bioinformatics*. – 2009. – Vol. 25. – № 16. – P. 2078–2079.
201. The significance of human jagged 1 mutations detected in severe cases of extrahepatic biliary atresia / T. Kohsaka, Z. R. Yuan, S. X. Guo [et al.] // *Hepatology*. – 2002. – Vol. 36. – № 4I. – P. 904–912.
202. The triangular cord ratio and the presence of a cystic lesion in the triangular cord. Suggested new ultrasound findings in the early diagnosis of Biliary Atresia / K. Ohyama, A. Fujikawa, T. Okamura [et al.] // *Pediatric surgery international*. – 2021. – Vol. 37. – № 12. – P. 1693–1697.

203. The value of preoperative liver biopsy in the diagnosis of extrahepatic biliary atresia: A systematic review and meta-analysis / J. Y. J. Lee, K. Sullivan, D. E. Demellawy [et al.] // *Journal of pediatric surgery*. – 2016. – Vol. 51. – № 5. – P. 753–761.
204. Total Serum Bilirubin within 3 Months of Hepatopertoenterostomy Predicts Short-Term Outcomes in Biliary Atresia / B. L. Shneider, J. C. Magee, S. J. Karpen [et al.] // *Journal of Pediatrics*. – 2016. – Vol. 170. – P. 211-217.e2.
205. Treatment Policy and Liver Histopathology Predict Biliary Atresia Outcomes: Results after National Centralization and Protocol Biopsies / M. Hukkinen, A. Kerola, J. Lohi [et al.] // *Journal of the American College of Surgeons*. – 2018. – Vol. 226. – № 1. – P. 46-57.
206. Tyraskis, A. Steroids after the Kasai procedure for biliary atresia: the effect of age at Kasai portoenterostomy / A. Tyraskis, M. Davenport // *Pediatric surgery international*. – 2016. – Vol. 32. – № 3. – P. 193–200.
207. Ultrasound, shear-wave elastography, and magnetic resonance imaging in native liver survivor patients with biliary atresia after Kasai portoenterostomy: correlation with medical outcome after treatment / M. Caruso, R. Cuocolo, F. D. Dato [et al.] // *Acta Radiologica*. – 2020. – Vol. 61. – № 10. – P. 1300–1308.
208. Ultrasound shear wave elastography: does it add value to gray-scale ultrasound imaging in differentiating biliary atresia from other causes of neonatal jaundice? / J. K. Sandberg, Y. Sun, Z. Ju [et al.] // *Pediatric radiology*. – 2021. – Vol. 51. – № 9. – P. 1654–1666.
209. Update to the Society of Radiologists in Ultrasound Liver Elastography Consensus Statement / R. G. Barr, S. R. Wilson, D. Rubens [et al.] // *Radiology*. – 2020. – Vol. 296. – № 2. – P. 263–274.
210. Validation of aspartate aminotransferase to platelet ratio for diagnosis of liver fibrosis and prediction of postoperative prognosis in infants with biliary atresia / L. Y. Yang, J. Fu, X. F. Peng [et al.] // *World journal of gastroenterology*. – 2015. – Vol. 21. – № 19. – P. 5893–5900.

211. Variants Associated with Infantile Cholestatic Syndromes Detected in Extrahepatic Biliary Atresia by Whole Exome Studies: A 20-Case Series from Thailand / S. Sangkhathat, W. Laochareonsuk, W. Maneechay [et al.] // *Journal of pediatric genetics*. – 2018. – Vol. 7. – № 2. – P. 67–73.
212. Vega, S. de Fibulins: multiple roles in matrix structures and tissue functions / S. de Vega, T. Iwamoto, Y. Yamada // *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. – 2009. – Vol. 66. – № 11–12. – P. 1890–1902.
213. Vij, M. Biliary atresia: pathology, etiology and pathogenesis / M. Vij, M. Rela // *Future science OA*. – 2020. – Vol. 6. – № 5.
214. Wang, K. S. Newborn Screening for Biliary Atresia / K. S. Wang // *Pediatrics*. – 2015. – Vol. 136. – № 6. – C. e1663–e1669.
215. Whole exome sequencing analysis for mutations in isolated type III biliary atresia patients / K. Gürünlüoğlu, A. Koç, K. Durmuş [et al.] // *Clinical and experimental hepatology*. – 2020. – Vol. 6. – № 4. – P. 347–353.
216. Xu, X. Biliary atresia in twins: a systematic review and meta-analysis / X. Xu, J. Zhan // *Pediatric surgery international*. – 2020. – Vol. 36. – № 8. – P. 953–958.
217. Yerina, S. E. Biliary Atresia/Neonatal Cholestasis: What is in the Horizon? / S. E. Yerina, U. D. Ekong // *Pediatric Clinics of North America*. – 2021. – Vol. 68. – № 6. – P. 1333–1341.
218. Zhao, D. Recent Advances in Etiology of Biliary Atresia / D. Zhao, X. D. Long, Q. Xia // *Clinical pediatrics*. – 2015. – Vol. 54. – № 8. – P. 723–731.